



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – UFPR
INSTITUTO CARLOS CHAGAS/FIOCRUZ – ICC
SETOR DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS



**GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
PARA DENGUE E HANTAVÍRUS – DESENVOLVIMENTO DE
INSUMOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO APLICADO A
SAÚDE**

GIOVANNY AUGUSTO CAMACHO ANTEVÊRE MAZZAROTTO

CURITIBA

2009

GIOVANNY AUGUSTO CAMACHO ANTEVÊRE MAZZAROTTO

**GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
PARA DENGUE E HANTAVÍRUS – DESENVOLVIMENTO DE
INSUMOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO APLICADO A
SAÚDE**

Trabalho final apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Biotecnológicos – Sub-área: Saúde Humana e Animal.

Orientadora: Dr^a. Claudia Nunes Duarte dos Santos

Co-orientador: Dr. Juliano Bordignon

CURITIBA

2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – UFPR
INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ – IBMP
SETOR DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

Esta tese intitulada:

**GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
PARA DENGUE E HANTAVÍRUS – DESENVOLVIMENTO DE
INSUMOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO APLICADO A
SAÚDE**

Apresentada por

Giovanny Augusto Camacho Antêvere Mazzarotto

Será avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Sílvio M. Zanata – UFPR, PR

Dra. Lia Sumie – UFPR, PR

Dr. Bruno Dallagiovanna – ICC, PR

Dr. Alejandro C. Dominguez – ICC, PR

Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos – ICC, PR

CURITIBA
MARÇO/2009

AGRADECIMENTOS

Escrevendo neste momento é possível notar a dimensão do auxílio que recebi durante a execução do presente projeto. Foram vários conselhos oferecidos com tanto zelo, diversas conversas nos corredores do instituto sempre com o objetivo de traçar diretrizes para melhorar a qualidade dos experimentos. Gostaria de agradecer especialmente a Dr^a Claudia Nunes Duarte dos Santos e ao Dr Samuel Goldenberg por terem me ofertado a valiosa oportunidade de trabalhar no Instituto Carlos Chagas, permitindo dessa forma o aprimoramento da minha bagagem científica. Gostaria de expressar imenso agradecimento ao Dr Juliano Bordignon por ter me acompanhado integralmente durante essa jornada, demonstrando ser um verdadeiro e competente mentor na área científica. Gostaria de agradecer a todos os colegas de trabalho do laboratório 03 do ICC, seja pelo apoio técnico imprescindível para a realização desse projeto, ou ainda pela paciência comigo devido aos momentos difíceis que passei longe da minha família. Sincero reconhecimento ao Dr Carlos Roberto Zanetti por seu auxílio em algumas etapas deste projeto, e por compartilhar alguns pensamentos e vivências, digamos, provindos de um plano muito além do que os olhos terrenos conseguem alcançar. Agradeço ao Dr Maurílio Soares por ter realizado a edição das fotos de imunofluorescência. Aos meus tios Rejane da Cunha Neves e Luis Mazzarotto sinceros agradecimentos por terem me acolhido em Curitiba durante esse período determinante da minha vida acadêmica. Gostaria de agradecer aos meus pais pela paciência e compreensão por esse período de distanciamento físico.

Agradeço a toda equipe do preparo de materiais do ICC/Fiocruz - PR (Nilson, Vanessa e Rafael), pois o trabalho deles é essencial para execução dos projetos do Instituto. Agradeço a Janaína Soares pela supervisão e cuidado intensivo dos animais do Biotério do ICC.

Ao CNPq e à Fundação Araucária, pelo apoio financeiro que viabilizaram a execução desse trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer a minha companheira Cilene de Souza Matias que tem me auxiliado de forma contínua em diversos aspectos da minha vida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 A dengue.....	01
1.1.1 Sintomas da dengue.....	04
1.1.2 Diagnóstico da dengue.....	06
1.2 A hantavirose.....	10
1.2.1 Sintomas da hantavirose.....	12
1.2.1.1 Febre hemorrágica com síndrome renal.....	12
1.2.1.2 Síndrome Cardio-pulmonar associada ao hantavirus (SCPH).....	12
1.2.1.3 Diagnóstico da hantavirose.....	13
2. Produção de anticorpos monoclonais utilizando a tecnologia de hibridomas.	17
3. JUSTIFICATIVA.....	21
4. OBJETIVO GERAL.....	23
4.1 Objetivos específicos.....	23
5. MATERIAIS & MÉTODOS.....	24
5.1 Células.....	24
5.2 Produção de antígenos.....	24
5.3 Animais.....	25
5.4 Imunizações.....	25
5.5 Produção e caracterização de anticorpos monoclonais.....	26
5.5.1 Retirada das amostras de baço e de soro pós-imune.....	26
5.5.2 Processamento das células para fusão.....	26
5.5.3 Fusão celular.....	27
5.5.4 Manutenção dos hibridomas.....	27

5.5.5 Triagem dos hibridomas.....	28
5.5.7 Ensaios de caracterização dos anticorpos.....	29
5.5.6 Estabilização e clonagem dos hibridomas.....	29
5.5.7 Ensaios de caracterização dos anticorpos.....	29
5.5.7.1 Isotipagem.....	29
5.5.7.2 Imunofluorescência Indireta.....	29
5.5.7.3 <i>Western blot</i>	30
5.5.7.4 cinética de crescimento celular.....	31
5.5.7.5 ensaios de Imunohistoquímica.....	31
6. RESULTADOS.....	32
6.1 Fusões para produção de mAbs anti-dengue e anti-rNH.....	32
6.2 Estabilização e caracterização dos anticorpos anti-rNH.....	32
6.3 Estabilização e caracterização dos anticorpos anti-DENV.....	46
7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	57
7.1 Considerações sobre a técnica de hibridomas desenvolvida por Kohler &.... Milstein, (1975)	57
7.2 Anticorpos monoclonais anti-dengue.....	60
7.3 Anticorpos monoclonais anti-nucleoproteína recombinante de hantavirus.....	63
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
9. CONCLUSÕES.....	70
10. PERSPECTIVAS.....	71
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
LISTA DE ANEXOS.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 6.1 - Fusões de denv -1, -2, -3, denv grupo específico e rNH de ARAUV	33
Tabela 6.2- Clonagem e isotipagem dos anticorpos anti-rNH.....	34
Tabela 6.3 - Clonagem e isotipagem dos anticorpos anti-DENV.....	37
Tabela 6.4 – Reatividade cruzada dos clones anti-DENV.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Organização do genoma do vírus da dengue.....	04
Figura 1.2 - Organização do genoma dos hantavírus.....	11
Figura 2.1 - Produção de mAbs por tecnologia de Hibridomas.....	18
Figura 2.2 – Bloqueio da síntese de DNA pela droga HAT e via de salvamento.	19
Figura 6.3 – Ensaio de western blot dos mAbs anti-rNH.....	35
Figura 6.4 - Ensaio de IFI dos mAbs anti-rNH em células VERO.....	38
Figura 6.5 – Ensaio de imuno-histoquímica com mAbs anti-rNH.....	39
Figura 6.6 – Crescimento celular dos Hibridomas anti-rNH.....	44
Figura 6.7 – Título de mAbs dos Hibridomas anti-hNH em cultura.....	45
Figura 6.8 – Ensaio de IFI com o mAb anti-DENV grupo-específico 4G2.....	48
Figura 6.9 – Ensaio de IFI dos mAbs anti-DENV 1.....	50
Figura 6.10 – Ensaio de IFI dos mAbs anti-DENV 2.....	51
Figura 6.11 – Ensaio de IFI dos mAbs anti-DENV 3.....	53
Figura 6.12 – Ensaio de <i>Western blot</i> dos mAbs anti-DENV -1, -2 e -3.....	56

LISTA DE SIGLAS

ADE – *Antibody-dependent enhancement*
Ag8.XP.3653 – Célula Mielômica de Camundongo
BALB/c – Bagg -Albino C
BCIP – 5 – *bromo-4-chloro-3-indolylphosphate*
C – Capsídeo
Células VERO E6 – Linhagem de célula renal do macaco verde africano, clone E 6
DAPI - 4'-6-*diamino-2-phenylindole*
DENV – Vírus da Dengue
DF – Febre da Dengue
DMSO - Dimetilsulfóxido
D.O – Densidade ótica
D.P.F – Dias pós-fusão
DSS – *Dengue Shock Syndrome* (Síndrome de Choque da Dengue)
DNA – Ácido Desoxinucleico
E – Proteína de Envelope
ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio enzimático por imunoabsorbância enzimática)
FD- Febre por dengue
FHD – febre hemorrágica da dengue
FIOCRUZ – Fundação Instituto Oswaldo Cruz
FITC – Isotiocianato de Fluoresceína
G1 – Glicoproteína 1
G2 – Glicoproteína 2
HAT – Hipoxantina, Aminopterina e Timidina
HCPS – Síndrome cardíaco-pulmonar associado à Hantavirus
HFRS – Síndrome Renal por Hantavirus
HGPRT – Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
H5N1 – Vírus Influenza A subtipo H5N1
HRP – *Horseradish peroxidase*
HT – Hipoxantina e Timidina
HTV – Hantavirus Hantaan

ICC – Instituto Carlos Chagas

IFI – Imunofluorescência indireta

IFN - Interferon

IgG – Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

Kb – Kilobase

kDa - Kilodáton

L – Segmento Maior

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública

M – Segmento Médio

mAbs – *Monoclonal Antibodies* (Anticorpos Monoclonais)

min – Minuto

mL– mililitro

MOI – multiplicidade de infecção

NBT - *Nitroblue tetrazolium*

NS – Proteína Não estrutural

PBS – *Phosphate buffered saline*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PrM – Proteína pré-membrânica

rNH - Nucleoproteína Recombinante de Hantavírus

RNA – Ácido Ribonucléico

RPMI – Meio *Roswell Park Memorial Institute*

RPM – Rotações por minuto

S – Segmento menor

SARS – Síndrome Respiratória Aguda Severa

SCD- Síndrome de choque por dengue

SDS - Dodecilsulfato de sódio

SEO – Hantavirus Seoul

SFB – Soro fetal Bovino

SNV – Virus Sin Nombre (Sem Nome)

SVS/MS – Sistema de vigilância sanitária do Ministério da Saúde

TBS – Tris buffered saline

TMB – 3- 5 - 5 – tetrametilbenzidina

TNF – *Tumor Necrosis Factor* (fator de necrose tumoral)

TK – Timidina Kinase

UI – Unidades internacionais

RESUMO

A dengue e a hantavirose são infecções virais que podem provocar quadros clínicos graves e óbito. A infecção por qualquer um dos sorotipos da dengue (-1, -2, -3 e -4) pode causar infecções assintomáticas ou com febre indiferenciada; febre hemorrágica da dengue (DHF), ou ainda síndrome de choque da dengue (DSS). A hantavirose, por sua vez, é uma doença emergente nas Américas e no Brasil causando uma síndrome cardiopulmonar (SCPH), com taxas de mortalidade em torno de 40%. Considerando que os sintomas da dengue e da hantavirose são pouco específicos para diferenciá-los de outras doenças febris, o desenvolvimento de diagnósticos laboratoriais para essas doenças torna-se de extrema importância. A detecção de antígenos virais por anticorpos monoclonais surge como uma alternativa de menor custo e maior rapidez para o diagnóstico da dengue e hantavirose. O objetivo do presente trabalho foi a produção e caracterização de linhagens celulares híbridas produtoras de anticorpos monoclonais (mAbs) contra três sorotipos do vírus da dengue circulantes no Brasil, e contra a nucleoproteína recombinante do hantavírus Araucária. Para a produção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais contra dengue animais foram inoculados com as cepas virais DEN1 BR-01/MR, DEN2 BR EN-02 e DEN3 BR 290-02 individualmente ou simultaneamente na tentativa de gerar mAbs grupo-específicos de dengue. Para a produção de monoclonais contra hantavirus camundongos foram imunizados com a nucleoproteína recombinante de hantavirus (rNH) expressa em sistema procariótico. Três dias após o término das imunizações os esplenócitos foram fusionados com a linhagem celular mielômica murina Ag8XP3653 utilizando polietilenoglicol. Os hibridomas gerados foram selecionados pelos meios HAT/HT durante doze dias. Os protocolos de fusão de dengue geraram 960, 660 e 984 clones para DEN1 BR-01/MR, DEN2 BR EN-02 e DEN3 BR 290-02, respectivamente. Foram triados 1100 clones por imunofluorescência indireta (IFI) e dois clones por ensaios de absorção imunoenzimático (ELISA) sendo obtidos 131 clones positivos (11.88%) com diferentes padrões de fluorescência. O protocolo de fusão para hantavirus gerou 440 clones, dos quais 352 foram clones triados por ensaios ELISA. Foram obtidos 174 clones positivos (43.5%). Uma parcela dos clones positivos foi estabilizada e subclonada gerando três clones estáveis da imunização com BR-01/MR (695 12C/2H, 512 10A/8A, 906 4H/9A); Três clones com a imunização da cepa de DEN2 BR EN-02 (658/9A, 646/9G, 332/2D); e três clones a partir da imunização com a cepa DEN3 BR 290-02 (424/8G, 918/6A, 920/11C). Através de ensaios de IFI os anticorpos 424/8G, 918/6A, 920/11C, 512 10A/8A, 906 4H/9A e 695 12C/2H mostraram-se reativos com as três cepas utilizadas no experimento. Diferentemente, os anticorpos 646/9G, 332/2D e 658/9A foram específicos para a cepa DEN2 BR EN-02. Ensaios de *western blot* demonstraram a reatividade dos clones 332/2D e 424/8G com as proteínas E dom B de DEN2 e prM/E de DEN3, respectivamente. Da etapa de fusão das linhagens celulares para a obtenção de anticorpos monoclonais para o antígeno de hantavírus foram obtidos 9 clones estáveis (350/8C, 581/8G, 475/8A, 313/11E, 572/7A, 432/6BF, 664/10G, 305/5A, 651/6G). Estes clones foram caracterizados através de ensaios de *western blotting*, IFI e imunohistoquímica. Os resultados obtidos indicaram especificidade dos mAbs no reconhecimento da proteína rNH nos diferentes ensaios, além da aplicabilidade dos mesmos em ensaios de imunohistoquímica. A produção de anticorpos monoclonais que possam ser utilizados tanto para a pesquisa básica, imunoterápicos ou como componentes em kits para o diagnóstico de diferentes agravos de notificação compulsória gera independência e autonomia na produção destes insumos em nosso país.

ABSTRACT

Dengue (DEN) and Hantavirus are viral infections that can lead to severe clinical symptoms and death. Infection by any of the dengue serotypes (-1, -2, -3, and -4) can be asymptomatic or cause an undifferentiated fever called dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever (DHF) or dengue shock syndrome (DSS). Hantavirus infection, in turn, is an emerging disease in the Americas and Brazil, causing human pulmonary syndrome (SCPH) with mortality rate around 40%. Because dengue and hantavirus infection symptoms are not specific to be used in a differential diagnostic against other fever diseases, the development of clinical diagnostic tools for these diseases is of extreme importance. Viral antigen detection by monoclonal antibodies is a low cost and fast alternative to the diagnostic of dengue and hantavirus infections. The aim of this work was the production and characterization of hybridoma cells line secreting monoclonal antibodies (mAbs) against the three serotypes of dengue circulating in Brazil, and against the Araucaria hantavirus recombinant nucleoprotein. Animals were inoculated with the viral strains DEN-1 BR-01/MR, DEN2 EN-02 and DEN3 BR 290-02 to produce hybridoma cells secreting mAbs. To generate mAbs against hantavirus, mice were immunized with a recombinant nucleoprotein (rNH) previously produced in a prokaryotic system. Three days after the immunization, splenocytes were fused with the murine cell line Ag8XP3653 using polyethyleneglicol. The hybridoma cells were selected through HAT/HT medium for twelve days. Dengue fusion protocols generated 960, 660, and 984 clones for DEN-1 BR-01/MR, DEN2 EN-02 and DEN3 BR 290-02, respectively. We screened 1100 clones by indirect immunofluorescence (IFI) and 2 clones by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), whereby we obtained 131 positive clones (11.88%) with different fluorescence levels. Hantavirus fusion protocols generated 440 clones, from which 352 clones were selected by ELISA screening with a yield of 174 positive clones (43.5%). Some clones were stabilized and subcloned producing three stable hybridoma cells from the BR-01/MR immunization (695 12C/2H, 512 10A/8A, 906 4H/9A), three hibridomas cells from the DEN2 BR EN-02 strain immunization (658/9A, 646/9G, 332/2D), and three hybridoma cells from the DEN3 BR 290-02 strain immunization (424/8G, 918/6A, 920/11C). Using IFI, we observed that the mAbs 424/8G, 918/6A, 920/11C, 512 10A/8A, 906 4H/9A e 695 12C/2H were reactive to all three strains used. On the other hand, the mAbs 646/9G, 332/2D e 658/9A were specifically reactive to the strain DEN2 BR EN-02. Western blot assays showed that the clones 332/2D e 424/8G were reactive to the proteins E dom B of DEN2 and prM/E of DEN3, respectively. Hybridoma cells obtained for the production of mAbs for hantavirus produced 9 stable clones (350/8C, 581/8G, 475/8A, 313/11E, 572/7A, 432/6BF, 664/10G, 305/5A, 651/6G). These clones were characterized by western blot, IF and immunohistochemistry. The results suggest that the mAbs have high specificity for the rNH protein, thus being applicable to immunochemistry assays. Production of mAbs that can be used for basic research, immunotherapy or as components of diagnostic kits creates independence for the production of these input materials in Brazil.

1. Introdução

1.1 A dengue

A dengue representa atualmente a principal arbovirose (*arthropod-borne virus*) tropical. É transmitida ao homem através da picada da fêmea de mosquitos hematófagos *Aedes aegypti*, mas outras espécies de mosquito podem agir como vetor dependendo da localização geográfica. Esta doença está presente em todas as zonas intertropicais do mundo e é responsável pela infecção de aproximadamente 100 milhões de indivíduos, acarretando cerca de 20.000 mortes por ano. No Brasil, no período de janeiro a abril de 2008 (semana epidemiológica nº14) a Secretaria de Vigilância em Saúde, órgão vinculado ao Ministério da Saúde, registrou 230.829 casos suspeitos de dengue, dos quais 1.069 casos foram confirmados como febre Hemorrágica da Dengue (FHD), totalizando 77 óbitos (PORTAL DA SAÚDE, 2008). Até o momento, não existem vacinas ou terapias anti-virais específicas disponíveis contra a dengue (Burke & Monath, 2001; Gonçalves et al., 2007).

O vírus da dengue (DEN) é um membro da família *Flaviviridae*, que é composta por vários vírus patogênicos ao homem tais como: febre amarela, encefalite japonesa e encefalite transmitida por carrapatos. Os vírus da dengue são classificados em quatro sorotipos distintos (-1, -2, -3 e -4), e todos sorotipos causam o mesmo tipo de quadros clínicos. O vírion é uma partícula esférica de ~50nm, envolta por um envelope lipoprotéico, cujo genoma é uma molécula de RNA fita simples com polaridade positiva, infeccioso, de ~11.000 nucleotídeos de extensão. O genoma contém uma única fase de leitura aberta que codifica para uma poliproteína precursora, clivada co-traducionalmente para gerar três proteínas estruturais que compõe a partícula viral: C (capsídeo), E (envelope) e prM (precursora da proteína de membrana M) além de sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Chambers et al, 1990; Lindenback & Rice, 2001) (Figura 1.1).

A proteína C (~11kDa) do vírus dengue é essencial para encapsidação do RNA genômico viral. Composta por uma região apolar extensa acredita-se que sua interação com o RNA e a membrana viral esteja baseada na distribuição assimétrica de cargas desta proteína (Ma et al., 2004).

A proteína E (~60 kDa) é o principal componente da superfície viral. Para expressão da proteína E em sua conformação antigênica nativa é necessária a sua associação com a proteína de pré-membrana (prM) (Rey et al., 1995; Roehrig et al., 1998; Modis et al., 2003; Rey, 2003). A proteína E contém determinantes antigênicos envolvidos em inibição da hemaglutinação (HI), neutralização (N) além de ser responsável pela indução de respostas imunológicas robustas em indivíduos infectados (Chen et al., 1996; Roehrig et al., 1998). Várias evidências indicam que a proteína E desempenha um papel importante na patogênese de diversos flavivírus, afetando a entrada e definindo o tropismo celular do vírus. A penetração dos vírus dengue na célula é mediada pela interação da proteína de envelope com receptores celulares ainda não completamente definidos presentes na superfície das células-alvo, além de moléculas de heparan-sulfato que parecem agir como co-receptores neste processo (Chen et al., 1997). Baseado nestes dados, Thullier et al., (2001) realizaram um estudo de mapeamento de epítomos relevantes envolvidos no processo de neutralização de todos os 4 sorotipos de dengue. No estudo em questão foram utilizados anticorpos monoclonais para bloquear o epítipo da proteína E responsável pela ligação às moléculas de heparan-sulfato. Este tratamento não aboliu totalmente, mas diminuiu a infectividade e gerou perspectivas para utilização de anticorpos dirigido contra regiões neutralizantes da proteína viral em terapias anti-dengue, ou até mesmo para o desenho de estratégias para a produção de uma vacina de caráter tetravalente. Oliphant et al., (2005) relatou a produção de um anticorpo monoclonal humanizado dirigido contra a proteína E do vírus West Nile (WNV - família *Flavivirus*). Este anticorpo foi capaz de neutralizar diferentes cepas de WNV *in vitro*. Ensaios *in vivo* revelaram que o anticorpo foi capaz de proteger camundongos da mortalidade induzida por WNV. Além disso, o mesmo anticorpo preveniu hamsters do sintoma de flacidez parálitica induzida por WNV (Morrey et al., 2008).

A proteína PrM é uma glicoproteína com aproximadamente 19 kDa, que contém 6 resíduos de cisteína altamente conservados capazes de formar três pontes dissulfídicas. A clivagem desta proteína gera a proteína M (8kDa) e esse processo é mediado por uma furina ou por uma protease tipo-furina durante o processo de maturação (Lindenback & Rice., 2001). No estudo de Bray & Lai, (1991) foi demonstrado que inoculação de camundongos com as proteínas prM e M é capaz

de conferir imunidade aos animais quando desafiados com vírus dengue. Porém, outro estudo relata que anticorpos anti-prM são capazes de aumentar a infecção por vírus dengue *in vitro*, sugerindo que anticorpos contra a proteína prM podem estar envolvidos na patogênese da doença (Huang et al., 2006). De acordo com essa informação, foi relatado que pacientes com infecções de dengue secundárias apresentavam altas taxas de anticorpos anti-prM quando comparado aos pacientes com infecções primárias. Adicionalmente, os anticorpos anti-prM foram predominantemente direcionados contra proteínas em seu estado conformacional (Lai et al., 2008).

Em relação a proteína não-estrutural NS1 é possível afirmar que a mesma é expressa sob três formas: associada ao retículo endoplasmático; ancorada à membrana ou ainda secretada. A forma secretada é um alvo importante na imunidade humoral e pode iniciar um processo significativo na patogênese da doença (Lindenbach & Rice, 2001; Libraty et al., 2002; Costa et al., 2006). Anticorpos monoclonais gerados contra a NS1 de uma cepa de DENV-2 foram capazes de reconhecer epítomos localizados no motivo protéico tri-amino ácido conhecido como ELK. Anticorpos dirigidos contra ELK foram associados com a formação de imuno-complexos contra células endoteliais, plaquetas e reação cruzada com o fibrinogênio, sendo estes processos relacionados com as formas mais graves da doença (Falconar, 1997).

As proteínas não estruturais NS2A, NS4A e NS4B, todas de natureza hidrofóbica, são menos caracterizadas que as demais proteínas do vírus dengue. Recentemente foi demonstrado que estas proteínas participam do mecanismo de bloqueio da via de interferon (IFN), atuando como um mecanismo de escape viral ao sistema imune do hospedeiro (Lindenbach & Rice, 2001; Jordan et al., 2005).

Dentre as proteínas não-estruturais, a melhor caracterizada é a NS3 que é uma proteína multifuncional. Apresenta atividade de serina-proteinase nos primeiros 180 aminoácidos sendo ativada por um cofator, que é a região hidrofóbica da proteína NS2B. A proteinase viral é responsável por várias das clivagens proteolíticas da poliproteína viral. Além disso, apresenta atividade de helicase envolvida na síntese do RNA viral e atividade de nucleotidetrifosfatase nos $\frac{3}{4}$ restantes da região carboxi (Falgout et al., 1991; Luo et al., 2008).

A proteína NS5, por sua vez, possui atividade de RNA polimerase dependente de RNA, responsável pela replicação do RNA viral, e de metiltransferase, envolvida na adição ao Cap ao RNA mensageiro, além de induzir a transcrição e tradução de IL-8, que atua como quimioatrativo para linfócitos durante o curso da infecção (Medin et al., 2005; Egloff et al., 2007).

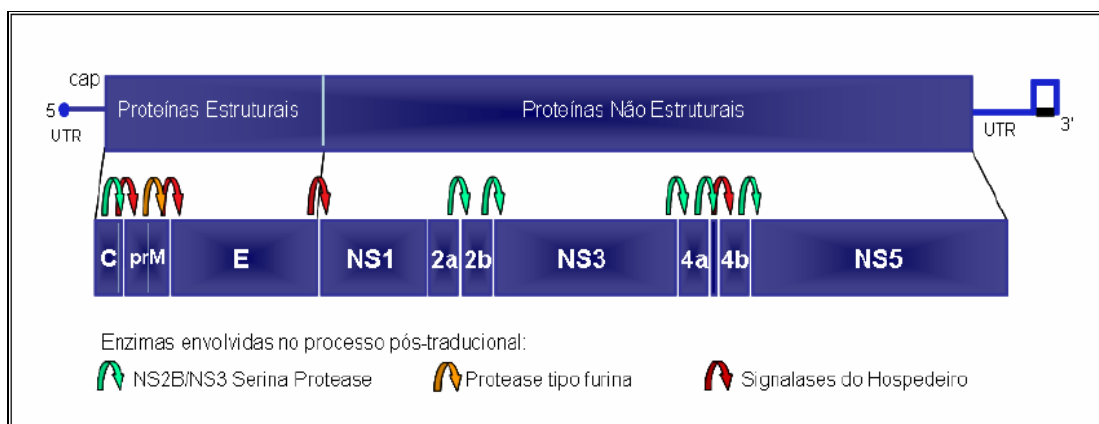


Figura 1.1 Organização do genoma do vírus da dengue. O genoma do vírus da dengue codifica uma poliproteína viral de ~3.400 aminoácidos. A poliproteína viral é clivada por proteases viral e do hospedeiro resultando em três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais (NS). Fonte: Adaptado de Desprès et al. (1993).

1.1.1 Sintomas da Dengue

Os quadros clínicos da doença no ser humano variam do tipo indiferenciado, no qual ocorrem febre, mialgia, artralgia, dor retrorbital, fotofobia e linfadenopatia denominado febre da dengue (FD), a casos mais graves, caracterizados com aumento da permeabilidade vascular causando edema, trombocitopenia e fenômenos hemorrágicos, caracterizando o quadro de febre hemorrágica da dengue (FHD), que pode evoluir para a síndrome do choque da dengue (SCD) – que decorre da hemorragia- levando o paciente a óbito (Rothman & Ennis, 1999; Welsh & Rothman, 2003). Relatos recentes mostram que o perfil clínico da dengue vem se modificando e têm sido relatadas complicações nos casos de FHD, como encefalopatia, hepatomegalia com insuficiência e falha hepática fulminante ou mesmo complicações neurológicas como confusão mental e síndrome de Guillain-Barré em pacientes cursando infecção por dengue (Rigau-Pérez et al., 1998; Solomon et al., 2000; Santos et al., 2004; Domingues et al., 2008).

Quatro mecanismos principais podem estar envolvidos no caso das formas mais severas da doença: a virulência da cepa infectante (Murgue et al., 1997); a presença de anticorpos não-neutralizantes capazes de facilitar a entrada do vírus em macrófagos (Halstead & O'Rourke 1977 *in* Thullier et al., 2001; Rothman & Ennis, 1999), fenômeno conhecido como *antibody dependent enhancement* (ADE); a reatividade cruzada de células T de memória gerando uma resposta celular ineficiente frente ao vírus original (*original antigenic sin*, Mongkolsapaya et al., 2003) e, finalmente, os anticorpos dirigidos contra a proteína não-estrutural NS1 podem reagir de maneira cruzada com o fibrinogênio, células endoteliais e trombócitos, dando início à cascata de eventos que levam ao quadro de hemorragia (Falconar, 1997).

Com relação a cepa infectante um estudo avaliou a relação de distintas cepas de DEN com as formas mais severas da doença. Observou-se que infecções secundárias por DENV-3 eram caracterizadas por níveis altos de anticorpos neutralizantes associados com baixa viremia e doença moderada. Neste caso, a memória humoral responsável pela resposta cruzada entre os sorotipos parece ter sido benéfica em infecções sintomáticas por DEN3, mas não em infecções por DEN1 e DEN2 (Endy et al., 2004). Até o momento não foi possível se estabelecer uma correlação entre alterações no genoma viral e gravidade da doença.

Com relação ao agravamento da infecção mediado pelo fenômeno de ADE é possível afirmar que os anticorpos envolvidos na indução do fenômeno são dirigidos para epítomos imunodominantes presentes na proteína E, formando imunocomplexos que se ligam à células que possuem o receptor Fc de macrófagos e monócitos, aumentando a penetração do vírus e conseqüente replicação viral. Recentemente, foi observado que o anticorpo monoclonal IgG 1A5 foi capaz de aumentar a infecção por vírus dengue de monócitos derivados *in vitro*. O mesmo fenômeno foi observado *in vivo* quando macacos Rhesus foram inoculados com diluições do anticorpo IgG 1A5. Observou-se ainda que a atividade de ADE variou entre os distintos sorotipos de DENV. Porém, este fenômeno foi drasticamente reduzido após a deleção de 9 aminoácidos na região N terminal do domínio CH₂ na região Fc do anticorpo. Em síntese, compilando estes resultados e correlacionando os mesmos com achados iniciais os autores sugerem o estabelecimento de um modelo primata para o estudo do fenômeno de ADE (Gonçalves et al., 2007).

A participação de linfócitos T na gênese das formas graves do dengue foi proposta em 2003 por Mongkolsapaya e colaboradores. Estes autores demonstraram que em infecções secundárias heterólogas ocorre uma ativação de linfócitos T de baixa afinidade para o sorotipo causador da infecção. Desta forma, as células T induzidas são ineficientes na eliminação do vírus, ocorrendo aumento da viremia e contribuindo para o desenvolvimento da FHD. Adicionalmente, estas células apresentam um fenótipo de apoptose antes de exercerem sua atividade anti-viral (Mongkolsapaya et al., 2003).

Quanto a formação de auto-anticorpos capazes de induzir manifestações mais severas da doença Falconar (1997) reportou a geração de anticorpos anti-NS1 capazes de reagir com fibrinogênio, trombocitos e células endoteliais. Lin et al., 2001 relataram que pacientes com sintomas de FHD e SCD apresentavam níveis altos de anticorpos IgM anti-plaquetas. Segundo os mesmos autores, a lise das plaquetas por esses anticorpos foi positivamente correlacionada com o nível de complemento no soro dos pacientes. A reatividade cruzada entre proteínas do vírus dengue, especialmente entre NS1 e plaquetas, foi demonstrada pelo uso de anticorpos monoclonais derivados de camundongos infectados com vírus dengue. A maior parte dos mAbs anti-plaquetas foram reativos para NS1 recombinante. A geração de anticorpos anti-plaquetas pode desencadear a destruição destas resultando em trombocitopenia. Estudos adicionais são necessários para a elucidação do mecanismo responsável pelo reconhecimento de proteínas próprias, porém já é claro que a formação de anticorpos com alta afinidade por plaquetas acontece após imunização secundária (Huang et al., 2008).

1.1.2 Diagnóstico da Dengue

Considerando que os sintomas iniciais da dengue são pouco específicos para diferenciá-los de outras doenças febris, o desenvolvimento de diagnósticos laboratoriais para essa doença torna-se extremamente importante. O diagnóstico da dengue pode ser realizado de forma direta ou indireta. O diagnóstico de forma direta inclui isolamento viral em cultura seguido por revelação da presença das partículas virais através de anticorpos específicos. Outras técnicas de detecção direta são os testes de imunohistoquímica e o teste molecular por RT-PCR, sendo este último o mais utilizado para o diagnóstico da dengue. Esta técnica é baseada na detecção do

RNA viral no soro de pacientes com suspeita, e quando os genes correspondentes às proteínas estruturais são utilizados, pode-se realizar simultaneamente a detecção e a tipagem do sorotipo através da técnica de PCR *semi-nested* (Lanciotti, et al., 1992; Arthur et al., 1992; Gomes et al., 2007). Existe ainda o RT-PCR quantitativo que além de detectar e tipar o sorotipo infectante é capaz de determinar a carga viral (Poerch et al., 2005; Sadon et al. 2008).

O diagnóstico indireto, por sua vez, inclui ensaios formato ELISA de captura para detecção de anticorpos IgM, e ELISA indireto para a demonstração de anticorpos da classe IgG no soro de pacientes (métodos mais comumente utilizados), ensaios de inibição da hemaglutinação e fixação de complemento, ambos pouco utilizados, além da técnica de soroneutralização (Reynes et al., 1994 ; Pavri & Ghosh, 1969). O teste utilizado no diagnóstico da dengue deve ser escolhido levando-se em conta a fase da doença com base na data do início dos sintomas no paciente. Porém, quando possível, testes pareados devem ser priorizados para definição mais precisa de infecções primárias e secundárias (Schilling, 2004).

O isolamento viral é considerado o teste padrão-ouro para o diagnóstico e sorotipagem das infecções por DEN. Porém é uma metodologia morosa, pois demanda infecção de culturas de células com amostras suspeitas, equipamentos e reagentes para análise dos resultados, além de pessoal técnico qualificado. A detecção de ácidos nucleicos virais oferece um diagnóstico mais rápido e sensível do que os métodos tradicionais de isolamento, mas requer técnicos especializados e equipamentos e reativos na maioria das vezes importados (Xu et al., 2006). Deste modo, testes diagnósticos sorológicos de formato simples e rápidos, como os ensaios do tipo ELISA, permitem a análise simultânea de um grande número de amostras, o que se apresenta como uma opção atrativa, especialmente no contexto epidêmico da dengue nas Américas.

Existem disponíveis no mercado alguns testes para o diagnóstico dengue, a maior parte utilizando o formato de ELISA. Vale salientar que a maioria chega ao Brasil importados de países europeus, EUA ou Austrália. Alguns destes kits pode detectar IgM e/ou IgG e distinguir simultaneamente uma infecção primária de uma infecção secundária. Como exemplo é possível citar o teste rápido Pan BioTM, onde IgG ou IgM são detectadas no soro de pacientes por um sistema baseado em imunocromatografia (Brisbane, Australia), e o kit Pan Bio DengueTM (Brisbane,

Australia), onde aos anticorpos contra o vírus dengue são detectados no soro de indivíduos com suspeita de dengue por testes em formato de ELISA de captura para IgM ou ELISA indireto para IgG (Cuzzubbo et al. 1999; Vajpayee et al. 2001). Este segundo teste (Pan Bio DengueTM) é o mais utilizado e é importado pelo governo brasileiro para ser distribuído aos centros de referência e LACENs que realizam o diagnóstico de dengue.

Alguns kits para dengue utilizam partículas virais inativadas obtidas de cultura celular ou extratos brutos. Porém, este tipo de metodologia esbarra em limitações que vão desde as variações entre lotes, uso de um grande número de animais e risco da manipulação de material patogênico (Borba, 2004). Outros kits utilizam antígenos recombinantes, geralmente a proteína E dos quatro sorotipos. Exemplo de um kit com antígenos recombinantes é o Duo Rapid Strip Test (PanBio, Brisbane, Australia). Este ensaio em formato de ELISA de captura é capaz de detectar imunoglobulinas da classe IgM e IgG utilizando a proteína E recombinante dos quatro sorotipos da dengue (Cuzzubbo et al., 2001). Além disso, kits produzidos mais recentemente utilizam a proteína NS1 recombinante. Existem no mercado dois kits comerciais no formato de captura: o Platelia (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, France) e o kit Pan (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia), ambos baseados na detecção de anticorpos anti-NS1, utilizando a proteína NS1 recombinante como antígeno, e capazes de detectar precocemente a infecção (Bessof et al., 2008). Embora a maioria dos testes para detectar a infecção pelo vírus dengue atualmente comercializados no Brasil apresente um bom desempenho, o uso de partículas virais inativadas como antígeno pode gerar reatividade cruzada com anticorpos gerados contra outros *Flavivirus*. Na tentativa de contornar esses problemas, a utilização de anticorpos monoclonais contra epítomos específicos do vírus da dengue tem se tornado uma alternativa viável para a inclusão em kits diagnósticos que utilizam como antígeno partículas nativas ou proteínas recombinantes (Groen et al., 2000). Diversos clones produtores de anticorpos anti-dengue já foram obtidos e caracterizados por imunização de animais com partículas virais nativas ou proteínas recombinantes (Falconar & Young, 1991; Roehrig et al., 1998; Antúñez et al., 2001).

Nawa et al. (2001) descreveram um kit para detecção de IgM contra dengue capaz de detectar a infecção na fase inicial da infecção. A metodologia empregada neste kit utiliza anticorpos monoclonais em uma das fases da reação.

Resumidamente, anticorpos anti-IgM foram fixados à fase sólida e após incubação das placas com o soro dos pacientes adicionou-se à reação antígenos virais tetravalentes. Os antígenos foram então detectados com o anticorpo monoclonal grupo – específico (4G2) ou com soro de pacientes contendo IgG contra o vírus dengue. Os resultados obtidos demonstraram que a utilização de um anticorpo monoclonal foi capaz de aumentar a especificidade da reação. Outros dois trabalhos descrevem o desenvolvimento de testes em formato de ELISA de captura, e que utilizam anticorpos monoclonais para a detecção da proteína não-estrutural NS1 do DENV-1 e DENV-2. Compilando o resultado destes dois estudos é possível afirmar que a utilização de anticorpos monoclonais em uma das fases da reação foi capaz de aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes (Young et al., 2000; Xu et al., 2006).

Outro estudo descreve a importância da utilização de anticorpos monoclonais em um kit em formato de Elisa de captura para a detecção do vírus da encefalite eqüina do leste (Família *Flavivirus*). Observou-se sensibilidade semelhante ao de ensaios desenvolvidos com anticorpos policlonais, porém o teste foi específico para cepas deste vírus encontradas somente na América do Norte. Segundo os autores a conversão de um kit de Elisa convencional para um formato baseado na utilização de anticorpos monoclonais resultou em um teste padronizado que poderá ser prontamente transferível para laboratórios que carecem de estrutura necessária para o isolamento viral como forma de diagnóstico de infecções causadas por este vírus (Brown et al., 2001).

A resposta humoral contra o vírus da dengue elícita anticorpos dirigidos principalmente contra as proteínas virais prM, E e NS1. Várias estratégias têm sido desenhadas para produzir anticorpos monoclonais capazes de reconhecer diferentes sorotipos do vírus dengue, de forma simultânea, através de construção de antígenos quiméricos contendo regiões conservadas entre os diferentes sorotipos (Ravalupali et al., 2005). Por outro lado, a maior parte das estratégias desenhadas para a produção de mAbs sorotipo específicos são baseadas na imunização de animais com proteínas não estruturais, como a NS1 (Falconar & Young, 1991; Xu et al., 2006) já que a maior parte dos mAbs grupo-específicos para dengue são dirigidos contra as proteínas prM e E (Chen et al., 2007). O fato é que a utilização de mAbs para confecção de kits para o diagnóstico da dengue pode levar a um aumento da

especificidade da reação, consequentemente melhorando a qualidade de kits destinados para a detecção deste agravo.

Uma vez que não existem vacinas e/ou terapias antivirais específicas contra a dengue, a única forma de se reduzir a mortalidade causada pela infecção é o diagnóstico. Uma detecção rápida e inequívoca da infecção permite a adoção de medidas de suporte ao paciente, como a hidratação, que contribui para reduzir a gravidade da doença. Portanto, torna-se crucial a disponibilidade de testes de diagnóstico de baixo custo, rápidos e específicos para dengue.

1.2 A hantavirose

As hantavirose são infecções causadas por um grupo de vírus relacionados sorológica e filogeneticamente, pertencentes ao gênero *Hantavírus*, família *Bunyaviridae*. As infecções estão associadas, de forma geral, com a inalação de aerossóis das excretas de roedores infectados. (Padula et al., 2000)

Os hantavírus possuem envelope, com genoma RNA de fita simples e polaridade negativa, tri-segmentado. O segmento L (*large*) de ~6,6 Kb codifica a RNA polimerase dependente de RNA (replicase viral), o segmento M (*medium*) de ~3,7Kb e o S (*small*) de ~1,9Kb, codificam respectivamente para as glicoproteínas do envelope G1 e G2 e a proteína do nucleocapsídeo (NP) (Hjelle et al., 1997; Gavrilovskaya et al., 1999) (Figura 1.2).

A proteína L dos hantavírus é uma transcriptase e replicase que transcreve os mRNAs e replica o RNA genômico usando um RNA anti-genômico como molde intermediário. Esta proteína também atua como endonuclease ao clivar RNAs celulares gerando primers utilizados como iniciadores de transcrição de RNAm (Kukkonen et al., 2005)

As glicoproteínas G1 e G2 são sintetizadas como uma poliproteína que é clivada durante o processo de translocação. G1 e G2 formam heterodímeros que posteriormente são estruturados como oligômeros que compõem as partículas da superfície do vírion.

A proteína NP é o principal componente antígeno do vírion e atua no processo de replicação do genoma viral ao permitir a iniciação da síntese de RNA pela polimerase viral (Yoshimatsu et al., 1996; Mir & Panganiban, 2006).

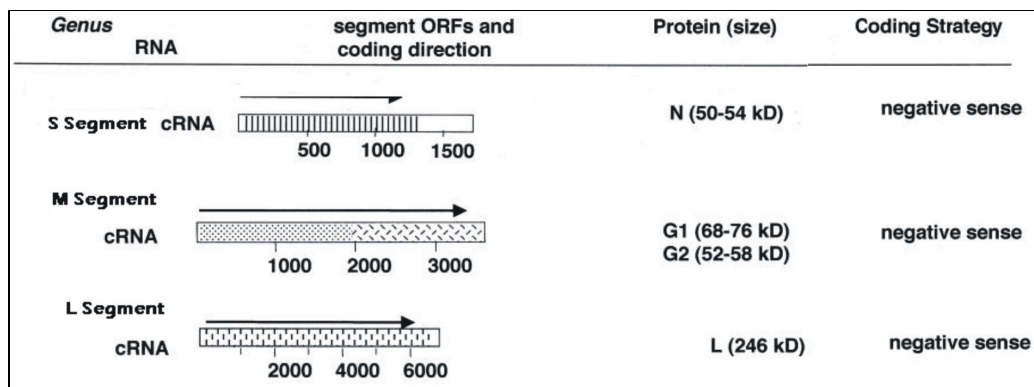


Fig 1.2 Regiões codificantes da família viral *Buyaviridae*. O genoma do hantavírus é composto por três segmentos (S, M e L) de RNA fita simples de polaridade negativa. Abaixo das caixas é listado o número aproximado de nucleotídeos. O segmento S codifica para a proteína N. O segmento M codifica uma poliproteína que passa por clivagem para formar as proteínas G1 e G2 e o segmento L codifica a proteína L, uma RNA polimerase dependente de RNA. Fonte: Nichol (2001).

Os hantavírus causam duas formas de doenças em humanos: febre hemorrágica com doença renal (HFRS) e síndrome cardíaco-pulmonar associada ao hantavírus (SCPH) (Schmaljohn & Hjelle, 1997). Estes vírus infectam de forma persistente roedores da família *Muridae*, subfamílias *Arvicolinae* (Europa), *Murinae* (Europa e Ásia) e *Sigmodontinae* (América) (Glass, 2002; Lednicky, 2003). A transmissão humana ocorre por meio de inalação de aerossóis gerados por fezes, urina e saliva de roedores infectados (Nuzum et al., 1988; Wong et al., 1988). A transmissão inter-humana foi relatada na Argentina e não pôde ser excluída em dois surtos de infecções familiares relacionado ao vírus Andes no Chile (Padula et al., 2000).

Em 1993 foram relatados os primeiros casos de hantavirose no Brasil, onde três indivíduos moradores da área rural de Juquitiba, SP, apresentaram quadro de febre, cefaléia, náuseas e vômito. Dois pacientes evoluíram com insuficiência respiratória aguda e foram a óbito. Exames sorológicos confirmaram o diagnóstico de hantavirose (Iverssen et al., 1994). Desde então, mais de mil casos de hantavirose foram notificados no Brasil, dos quais 648 evoluíram para cura e 429 para óbito. A região Sul se destaca com maior número de casos (n = 422), seguido pela região Sudeste com 333 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). As exposições ao agente infeccioso estiveram claramente relacionadas com atividades ocupacionais como agricultura (Mendes et al., 2001) em regiões de reflorestamento

(Engelthaler, 1999), e mais recentemente relacionadas às atividades de ecoturismo, pesca, entre outras atividades de lazer (Pini et al., 2003; Armien et al., 2004). A enfermidade não é específica de nenhum grupo étnico e comporta-se de forma sazonal coincidindo com a presença e o maior percentual de roedores portadores do vírus (Elkoury et al, 2005).

1.2.1 Sintomas da Hantavirose

1.2.1.1 Febre hemorrágica com síndrome renal

A febre hemorrágica com síndrome renal (FHSR) é o nome recomendado pela Organização Mundial de Saúde para designar um complexo de doenças infecciosas agudas hemorrágicas com disfunções renais, caracterizadas por apresentar-se como uma síndrome febril de início súbito, manifestações hemorrágicas e insuficiência renal aguda (Ahn et al, 2000). Esta patologia foi identificada em 1913 em países da Europa e Ásia. Em todo o mundo, 200.000 casos de FHSR são notificados anualmente com uma letalidade variando de 1% a 15%. O primeiro hantavirus foi isolado em 1976 a partir de tecido pulmonar de roedores silvestres *Apodemus agrarius coreae* e foi denominado vírus Hantaan - devido à proximidade dos sítios de infecção com o rio Hantaan, Coreia - e é o agente etiológico da febre hemorrágica da Coreia, que infectou mais de 3000 soldados durante a guerra da Coreia (1951-1953). Estes estudos propiciaram um notável avanço no conhecimento das formas de transmissão e disseminação da FHSR (Lee & Johns, 1978).

1.2.1.2 Síndrome cardíco-pulmonar associada ao hantavírus

A síndrome cardíco-pulmonar associada ao hantavírus (SCPH) é uma doença de rápida progressão iniciando com uma febre moderada que pode evoluir para edema pulmonar não-cardiogênico e choque, com uma taxa de mortalidade de até 50%. Inicialmente foi descrita em pacientes do sudoeste dos Estados Unidos em 1993, sendo subseqüentemente identificado em 28 estados americanos e no Canadá (Nichol et al. 1993). Posteriormente, casos de SCPH foram identificados na América do Sul indicando que estes agentes estão amplamente dispersos (Weissenbacher et al. 1996; Johnson et al, 1997; Levis et al, 1998; Lednicky, 2003).

Menos de uma década após a descrição inicial, a SCPH tornou-se uma zoonose pan-americana e atualmente o número de espécies de hantavírus assim como seus potenciais roedores reservatórios *Sigmodontinae* vem aumentando significativamente, especialmente na América do Sul (Peters & Khan, 2002; Svetlana et al., 2005; Günter et al., 2008).

Investigações laboratoriais de pacientes com SCPH, pelos métodos sorológicos e por RT-PCR, identificaram o agente etiológico desta patologia, como sendo um hantavírus denominado vírus Sin Nombre (SNV). O roedor silvestre *Peromyscus maniculatus* foi identificado como o reservatório deste vírus (Nichol et al., 1993). Após a infecção pelo SNV o período de incubação varia de 8-20 dias e 40% dos pacientes morre 1-3 dias após o aparecimento de sintomas respiratórios, muitas vezes acarretados pelo choque cardiogênico.

Até o presente momento não há vacina, drogas antivirais ou imunomoduladoras para tratamento da hantavirose. A doença atinge pessoas de todas as faixas etárias e a progressão da mesma é rápida (Nichol, 2001; Peters & Khan, 2000; Lednicky, 2003).

A alta taxa de mortalidade observada em pacientes infectados, a curta duração da doença e a possibilidade de transmissão inter-humana, como descrito em um surto na Argentina envolvendo 16 pessoas (Padula et al., 2000) aumentam a necessidade de utilizar testes com maior sensibilidade para o diagnóstico precoce melhorando dessa forma o tratamento e manejo do paciente com SCPH reduzindo a mortalidade associada à infecção.

1.2.1.3 Diagnóstico da Hantavirose

O diagnóstico da hantavirose pode ser realizado de forma direta através de ensaios de isolamento e imunohistoquímica, ou de forma indireta através de variações da técnica de PCR e ELISA. Porém, devido ao baixo custo associado a eficiência, o teste ELISA é o mais utilizado para o diagnóstico da hantavirose.

A hantavirose é uma doença de notificação compulsória no Brasil e sua confirmação é feita em laboratórios de referência do Ministério da Saúde através de testes sorológicos de pesquisa de anticorpos da classe IgM (Infecções agudas) e IgG (fase convalescente e detecção em roedores reservatórios). Alguns ensaios no formato de Elisa, *immunoblotting* e testes rápidos por imunocromatografia já foram

desenvolvidos para o diagnóstico da hantavirose. Para a produção dos kits com formato de Elisa na maioria das vezes são utilizadas proteínas virais completas dos domínios protéicos expressos em diferentes sistemas (Feldmann et al., 1993; Elgh et al. 1996). No entanto, alguns trabalhos relatam reações não específicas com soro de pacientes que contém anticorpos dirigidos contra *E.coli*. Este fato ocorre quando as proteínas recombinantes são expressas em sistema procariótico (Sjölander et al. 1997). Por isso, várias estratégias para a produção de antígenos virais em sistema de células de mamíferos e de insetos têm sido exploradas para o desenvolvimento de diagnósticos mais específicos para hantavirose (Hjelle et al., 1997; Kokko et al., 2000; Billecocq et al., 2003).

Como exemplo do desenvolvimento de kits para diagnosticar a hantavirose é possível citar um kit, em formato de ELISA, capaz de detectar imunoglobulinas IgG, IgA e IgM do soro de pacientes (Meisel et al., 2006). Este kit foi baseado na utilização de nucleoproteína recombinante dos hantavirus Puumala e Dobrava, expressa em sistema de levedura (para detecção de IgA e IgG) e em células Schneider S2 (*Drosophila melanogaster*) (para detecção de IgM). A sensibilidade e a especificidade dos Elisas para detecção de IgM, IgA e IgG contra os vírus Puumala e Dobrava foi de 100%, conforme observado em um painel de soro de pacientes negativos e amostras bem caracterizadas de soro de pacientes confirmadamente infectados por DOBV e PUUV. Estes dados sugerem que o uso combinado de Elisas para a detecção de IgG, IgM e IgA poderia ser utilizado para diagnosticar infecções agudas causadas por hantavirus na Europa Central (Meisel et al., 2006).

Outro estudo descreve a utilização de teste rápido, baseado em imunocromatografia, para a detecção de anticorpos tipo IgM contra hantavírus (POC PUUMALA, Reagentia Ltda., Toivola, Finland). Este kit utiliza a nucleoproteína recombinante do vírus PUUMALA fixada em fase sólida. Esta proteína é capaz de reagir de forma cruzada com anticorpos gerados contra outros hantavirus e tem se mostrado útil para a detecção de nefropatia epidêmica associada com o vírus Puumala na Europa. Adicionalmente, foram testadas com este kit soro de pacientes residentes no Sul do Chile com suspeita de infecção por hantavirus. Neste caso, a sensibilidade e a especificidade do kit POC PUUMALA foram de 97% e 90%, respectivamente (Navarrete et al., 2007). Outro estudo avaliou dois kits comercialmente disponíveis para a detecção de hantavirose, sendo um kit no formato de ELISA (MRL diagnostics) utilizado para a detecção de IgM e IgG contra

vários sorotipos de hantavirus; e outro kit no formato de imunofluorescência indireta (Progen) baseado em lâminas contendo células infectadas com vírus Hantaan e Puumala. Através da avaliação de 145 amostras observou-se sensibilidade e especificidade superior a 90% com os dois kits testados (Koraka et al., 2000).

Atualmente, no Brasil, utiliza-se o ensaio imunoenzimático (ELISA) como teste diagnóstico para detectar a infecção por hantavírus. Os antígenos recombinantes utilizados neste ensaio são cedidos pelo Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC, EUA) ou pelo Instituto Dr Carlos G Malbrán (Argentina). Estes antígenos são gerados a partir de hantavirus que não circulam no país e embora apresentem resultados aceitáveis, não passaram por nenhum processo de validação para utilização em diagnóstico de hantavirose no Brasil. O único kit comercial para detecção de hantavirus disponível para aquisição no Brasil, o *Focus*[®], utiliza um pool de antígenos recombinantes de diferentes hantavirus circulantes na América do Norte e Velho Mundo e os resultados observados indicam baixa sensibilidade e especificidade (Raboni et al. 2007). Em adição, preço médio deste kit é de R\$ 3.000,00.

Recentemente o Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz-PR desenvolveu um kit para o diagnóstico da hantavirose. A confecção do kit, denominado “IBMP EIE IgM e IgG Hantec”, utiliza a nucleoproteína recombinante (rNP) de uma cepa de hantavirus circulante no Paraná expressa em sistema procariótico (hantavirus Araucária – ARAUV ; Raboni et al. 2007).

O kit foi submetido a um processo de validação utilizando amostras de soro humano e de roedores de todas as regiões do Brasil e da Argentina, Uruguai, Chile e Peru. Os resultados obtidos foram altamente satisfatórios e atualmente o Ministério da Saúde optou pela distribuição do kit “IBMP EIE IgM e IgG Hantec” para todos os Centros de Referência e alguns laboratórios estaduais do Brasil que realizam o diagnóstico de hantavirose (Raboni, 2006).

A produção dos primeiros anticorpos monoclonais específicos para hantavírus (Franko et al., 1983) permitiu o desenho de novas estratégias para melhorar o desempenho dos kits para o diagnóstico da hantavirose. Proteínas recombinantes podem gerar reações cruzadas indesejáveis entre diversos hantavírus, ou mesmo com bactérias quando se utiliza vetores procarióticos para expressão da proteína viral recombinante. Neste caso a utilização de mAbs como insumos dos kits para o diagnóstico de hantavirose tem permitido a detecção

específica desse agente infeccioso. Até o momento já foram gerados mAbs contra as glicoproteínas G1 e G2 do vírus Hantaan. Estes anticorpos possibilitaram a localização de regiões antigênicas relacionadas ao processo de neutralização viral (Arikawa et al., 1989). Em 1992, foram produzidos contra as glicoproteínas G1 e G2 do vírus Puumala e novamente observou-se atividade neutralizante significativa dos anticorpos gerados. Estes resultados sugerem a existência de pelo menos um domínio neutralizante em cada uma das glicoproteínas (Lundkvist & Niklasson, 1992).

Porém os trabalhos não ficaram detidos apenas na utilização de mAbs anti-glicoproteínas. Ha et al., (1995) relataram a produção de um painel com anticorpos monoclonais com diferentes padrões de reatividade contra a proteína NP do vírus Hantaan vacinal. Os resultados observados confirmam a presença de múltiplos epítomos sorotipo-específico úteis para a diferenciação de sorotipos. Zöeller et al., (1995) descrevem a uso da NP recombinante das cepas Hantaan e Puumala, juntamente com a utilização de anticorpos monoclonais, para compor um sistema de detecção de anticorpos anti-hantavírus. Segundo os autores o objetivo do estudo foi confeccionar um kit no formato de ELISA de captura. O kit foi avaliado contra um painel de soro de pacientes com suspeita de HFRS oriundos de várias regiões geográficas. Como resultado observou-se sensibilidade e especificidade do teste de 100%.

Os mAbs anti-hantavírus têm ampla aplicação não só no campo do diagnóstico mas também no tratamento de pacientes infectados por hantavirus. Xu et al., (2002) produziram 18 mAbs dirigidos contra o hantavirus Hantaan. Destes mAbs, 13 foram direcionados contra a NP; 4 foram direcionados contra a glicoproteína G2 e 1 mAb reagiu de forma cruzada com a NP e com a glicoproteína G2. Somente os mAbs que reconheceram epítomos em G2 foram positivos nos testes de inibição da hemaglutinação e em testes de neutralização viral *in vitro* e *in vivo*. Estes mAbs se mostraram muito úteis tanto na pré- como para pós-profilaxia da infecção, bem como na imunoterapia para o hantavírus Hantaan em modelo murino e atualmente estão sendo utilizados em ensaios clínicos de fase II em pacientes de áreas endêmicas da China (Xu et al., 2002).

2. Produção de anticorpos monoclonais (mAbs) utilizando a tecnologia de hibridomas

A produção e caracterização de anticorpos foram radicalmente alteradas em 1975 quando Kohler & Milstein descreveram a técnica de produção de anticorpos monoclonais (mAbs) por uma linhagem de células denominada hibridoma (Kohler & Milstein, 1975; Oi et al. 1984). Os autores descreveram a geração de células produtoras de anticorpos monoclonais anti-hemácias de carneiro obtidas da fusão de células mielômicas e linfócitos B de camundongos imunizados com hemácias de carneiro. Nesta técnica foi utilizado como agente indutor da fusão o vírus Sendai inativado (Kohler & Milstein, 1975).

Os linfócitos B (esplenócitos) são células produtoras de anticorpos, mas que possuem vida curta *in vitro*, sendo muito difícil cultivá-las. As células mielômicas, por sua vez, são linfócitos modificados que não produzem anticorpos, mas têm a característica de serem células imortalizadas (células tumorais) com alta capacidade mitótica e vida longa em cultivo. Da fusão destas duas linhagens obtém-se uma célula híbrida que apresenta alta capacidade de produzir anticorpos específicos e ser cultivada *in vitro* indefinidamente (Abbas, Lichtman & Pilai, 2008). Resumidamente, os protocolos atualmente utilizados para a produção de mAbs consistem, em uma primeira fase, na fusão das duas células com auxílio do agente fusogênico polietilenoglicol, seguido pela seleção das células híbridas em meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina), verificação da presença dos anticorpos de interesse no sobrenadante de cultura e seleção de célula única (monoclonal) por diluição limitante (Kohler & Milstein, 1975; Oi et al. 1984) (Figura 2.1). Em uma fase posterior as propriedades desses mAbs, tais como afinidade, isótipo e especificidade são caracterizadas. A terceira fase da tecnologia de produção de mAbs é a produção em grande escala (Falkenberg, 1998).

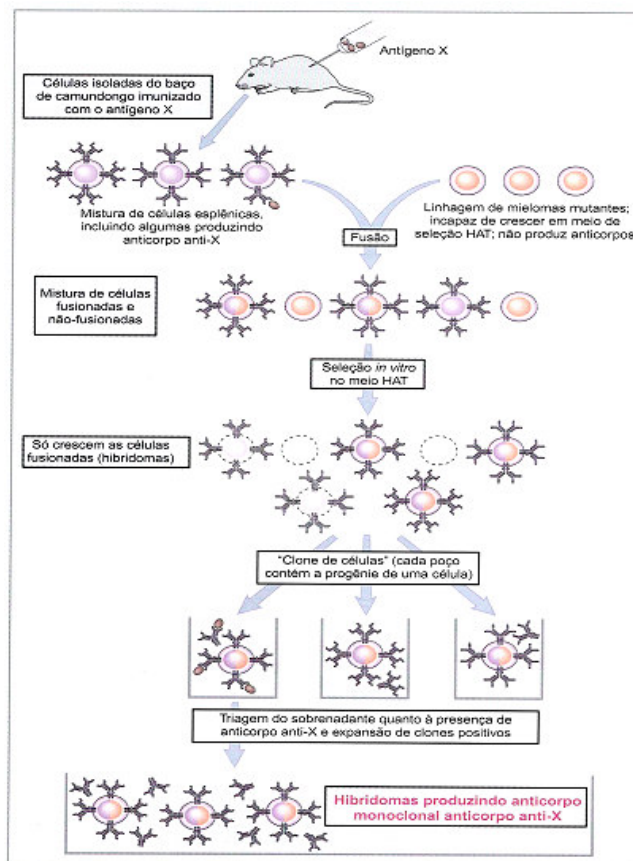


Figura 2.1 Produção de anticorpos monoclonais pela tecnologia de hibridomas. Imunização, fusão celular, seleção de hibridomas, diluição limitante, triagem dos hibridomas. Fonte: Kuby, (2002).

O sucesso da técnica depende principalmente da seleção das células híbridas em meio HAT. Este meio seleciona os hibridomas, pois não permite a multiplicação das células tumorais não fusionadas. As células normais sintetizam nucleotídeos e timidilato por uma via chamada *de novo*, na qual se utiliza fosforibosil pirofosfato e uridilato. Num dos passos dessa via ocorre à transferência de um grupo metil ou formil de um tetrahidrofolato ativado. Drogas anti-folatos, como a aminopterina bloqueiam a reativação do tetrahidrofolato inibindo a síntese de purinas e timidilato, substâncias que são necessárias para a síntese de DNA. As células normais tratadas com aminopterina utilizam uma via de salvamento (*savage*) que utiliza hipoxantina e timidina através das enzimas hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT) e timidina quinase (TK), para síntese de nucleotídeos e timidilato. Entretanto, células tumorais que não têm a HGPRT e a TK sintetizam purinas não funcionais e produtos letais a célula. Desta forma, o meio HAT

forneendo a aminopterina bloqueia a síntese de DNA pela via *de novo*, o que inviabiliza a sobrevivência das células tumorais (que não fundiram ou que fundiram entre si), pois esta não tem uma via alternativa. Já as células tumorais que fusionaram com os esplenócitos conseguem sobreviver, pois contém as enzimas HGPRT e TK (proveniente dos esplenócitos) e a hipoxantina e a timidina disponíveis no meio de cultura, permitindo assim, a utilização da via de salvamento (Figura 2.2). Os esplenócitos que não fundiram ou que fundiram entre si, têm uma sobrevida curta e morrem naturalmente após duas semanas de cultivo (Abbas, Lichtman & Pilai, 2008).

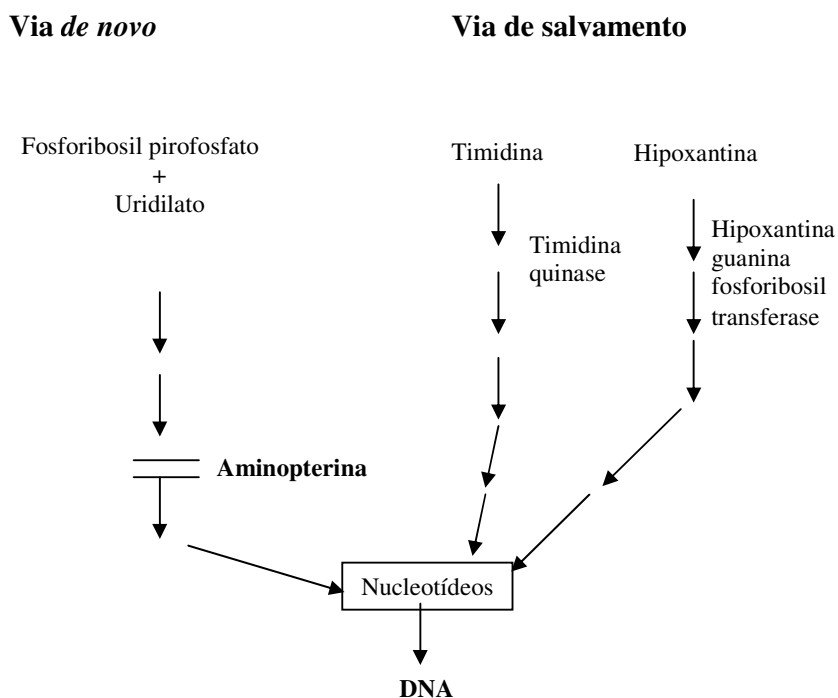


Figura 2.2 Bloqueio da síntese de DNA pela via de novo pela droga aminopterina e ativação da via de salvamento (Abbas, Lichtman & Pilai, 2008).

Com o advento da técnica de produção de anticorpos monoclonais por fusão celular, muitos campos da imunologia e medicina apresentaram um formidável avanço, mas um em especial foi o mais favorecido: o imunodiagnóstico. Os mAbs são reagentes ideais para confecção de kits de diagnóstico para doenças infecciosas, sorotipagem de microrganismos, controle e diagnóstico de tumores,

devido, principalmente, a alta especificidade dessas biomoléculas (Nowinski et al., 1983; Herzenberg & De Rosa, 2000).

Os avanços da biologia molecular, envolvendo a manipulação de seqüências de genes *in vitro*, e a expressão dessas seqüências manipuladas em sistemas de bactérias, fungos e cultura de células de mamíferos, tem providenciado métodos para re-engenharia de mAbs murinos para substituir de forma parcial a seqüências do anticorpo do roedor por seqüências funcionalmente equivalente de humanos. Desta forma, a possibilidade de reações adversas torna-se reduzida sem, no entanto, reduzir as propriedades de reconhecimento do anticorpo original. A maior parte dos anticorpos para tratamentos terapêuticos é desenvolvida em plataformas de *phage display* ou em camundongos transgênicos capazes de expressar repertórios completos de imunoglobulinas humanas (Lonberg, 2008).

3. Justificativa

As viroses constituem graves problemas de saúde pública, tanto em termos de risco de infecções massivas como nos impactos econômicos gerados. Atualmente vários são os exemplos de novas doenças ou re-emergência de doenças consideradas antigas, transmitidas por vírus, como a SARS e a gripe transmitida pelo H5N1, respectivamente (Peiris, 2006). No Brasil, dois bons exemplos são a dengue e a hantavirose.

A dengue foi controlada em nosso país entre as décadas de 40-80, devido a redução da população do mosquito vetor. No entanto, houve uma reinfestação na década de 80 e desde então epidemias sucessivas de dengue são registradas. Foram notificados no Brasil 230.829 casos de dengue no ano de 2008 (dados da semana epidemiológica n° 14 compreendidos de janeiro a março de 2008), dos quais 1.069 foram confirmados como casos de febre hemorrágica (FDH) (PORTAL DA SAÚDE, 2008).

Por outro lado, a hantavirose foi inicialmente detectada em nosso país em 1993 no estado de São Paulo, associada à casos de insuficiência respiratória. Desde sua introdução em 1993, foram diagnosticados 1077 casos até agosto de 2008, com taxa de mortalidade em torno de 40% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Com o fortalecimento das medidas de vigilância epidemiológica estes números tendem a crescer.

Uma vez que não existem vacinas e/ou terapias antivirais específicas contra a dengue e a hantavirose, a única forma de se reduzir a mortalidade por ambas as infecções é o rápido e preciso diagnóstico laboratorial. O diagnóstico rápido e inequívoco permite a adoção de medidas de suporte ao paciente, como a hidratação no caso da dengue e a ventilação mecânica no caso da hantavirose, que contribuem para reduzir a gravidade das infecções. Portanto torna-se crucial o desenvolvimento de testes de diagnóstico de baixo custo, rápidos e específicos para estes dois agravos. A produção de mAbs específicos permitirá aumentar tanto a sensibilidade como a especificidade dos testes, especialmente na detecção de pacientes em fase aguda de doença, já que a maior parte destes ensaios segue o formato de captura. É importante salientar que o desenvolvimento de kits para o diagnóstico destas enfermidades permitirá que o país reduza os custos da importação de insumos. Por exemplo, o teste comercial utilizado para diagnóstico da dengue fornecido pelo

governo federal (PanBio, Austrália) custa aproximadamente R\$27,60 por teste, valor que pode ser substancialmente reduzido com a produção de um teste nacional.

Recentemente, o Laboratório de Virologia do Instituto Carlos Chagas (ICC) desenvolveu um ensaio imunoenzimático do tipo ELISA, para a detecção precoce de anticorpos das classes IgM e IgG no soro de pacientes com suspeita de hantavirose e de pacientes em fase convalescente, assim como em roedores reservatórios (Raboni et al., 2007). Para aumentar a robustez destes ensaios, um insumo de extrema importância para ser incluído nestes testes são antisoros policlonais específicos ou anticorpos monoclonais dirigidos contra epítomos definidos.

Além disso, a produção de anticorpos monoclonais é extremamente limitada no Brasil, na maioria das vezes sendo produzido de forma artesanal e em pequena escala, apenas para atender a demanda interna de alguns laboratórios. Este tipo de reagente é utilizado de forma rotineira na maioria dos laboratórios de pesquisa que utilizam técnicas de biologia celular e imunologia, e em geral é importado a preços elevados. Em virtude disso, decidimos estabelecer no ICC a plataforma de produção de anticorpos monoclonais tanto para uso em pesquisa básica como insumo no desenvolvimento de testes diagnósticos. Finalmente, percebemos que a implementação de um laboratório produtor destes insumos (anticorpos monoclonais) deverá representar um grande avanço no mercado biotecnológico brasileiro, agregando valores aos testes desenvolvidos, possibilitando a independência tecnológica e reduzindo o tempo para realização das pesquisas, bem como, seu custo.

4. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho é a produção e caracterização de células híbridas (hibridomas) produtoras de anticorpos monoclonais contra o vírus da dengue sorotipos -1, -2 e -3 circulantes no Brasil, e contra a nucleoproteína recombinante do hantavírus Araucária.

4.1 Objetivos Específicos

1. Produzir e caracterizar hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (mAbs) específicos contra partículas do DENV-1, -2 e -3.
2. Produzir e caracterizar hibridomas secretores de anticorpos monoclonais que reconheçam simultaneamente os sorotipos 1, 2 e 3 do DENV (grupo-específico).
3. Produzir e caracterizar hibridomas secretores de anticorpos monoclonais que reconheçam a rNH.
4. Clonar e isotipar todos os anticorpos produzidos.
5. No caso dos anticorpos anti-dengue, definir os alvos protéicos reconhecidos pelos anticorpos.

5. Materiais e Métodos

5.1 Células

Células de linhagem C6/36 de mosquito *Aedes albopictus* foram propagadas em meio Leibovitz's L15 suplementado com 3% de soro fetal bovino (SFB), 25 µg/mL de gentamicina e 0.27 % triptose e mantidas a 28°C. As células mielômicas da linhagem Ag8xP3653 foram propagadas em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP. BR), suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1mM de piruvato de sódio, 2mM de L-glutamina, estreptomicina, gentamicina (25 µg/mL), penicilina/estreptomicina (50UI/µg/mL), anfotericina B (1.25 µg/mL) (Gibco, Grand Island, NY. USA) e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

5.2 Produção dos antígenos

Para a produção dos anticorpos monoclonais anti-DENV, utilizaram-se cepas virais DENV-1, -2 e -3 recentemente isoladas no Brasil. Todas as amostras de DENV utilizadas foram obtidas do soro de pacientes com febre da dengue nos anos de 2001, para DENV-1 (BR/01-MR), e 2002 para DENV-2 (EN-02) e -3 (BR DEN3 290-02). As amostras foram encaminhadas ao nosso laboratório para confirmação do diagnóstico por isolamento viral. Após o isolamento, culturas de células C6/36 foram infectadas com o vírus por até 4 passagens, e purificados em gradiente de sacarose. (Gould et al., 1986). Estas amostras foram utilizadas para imunização dos animais ou infecções de células C6/36 para a etapa de triagem dos mAbs. O material purificado em gradiente de sacarose foi armazenado em freezer -70°C. Os títulos dos estoques virais foram determinados por ensaios de titulação viral por imunodeteção de foco (FIA), em células C6/36, de acordo com Desprès et al. (1993).

Para produção do anticorpo monoclonal contra o hantavírus Araucária utilizou-se a rNH obtida anteriormente no Laboratório de Virologia Molecular do ICC (Raboni et al., 2007). A rNH foi produzida pela clonagem no plasmídeo pQE30 da região codificante do gene e sua expressão obtida em células de *Escherichia coli*, conforme descrito previamente por Raboni et al., (2006).

5.3 Animais

Foram utilizados 20 camundongos isogênicos, com aproximadamente 6 semanas de idade, da linhagem Balb/c provenientes do biotério do ICC para produção dos anticorpos monoclonais anti-DENV-1 (4 animais), anti-DENV-2 (4 animais), anti-DENV-3 (4 animais), anti-rNH (4 animais). Adicionalmente, foram inoculados 4 animais com os vírus DENV-1, -2 e -3, visando aumentar a chance de seleção para o reconhecimento de epítomos conservados entre os 3 sorotipos do DENV (grupo-específico). Durante o experimento todos os animais foram alimentados com ração comercial *pelletizada* e água *ad libitum*, e mantidos em fotoperíodo de 12h claro/12h escuro, e temperatura ambiente entre 23°C ± 2°C. Todos os procedimentos de manejo, testes e obtenção de material biológico seguiram as premissas indicadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) em consonância com o *Canadian Council of Animal Care*. Adicionalmente, os experimentos envolvendo animais foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa com animais da Universidade Federal do Paraná (UFPR) com o processo n° 23075.031314/2008-41.

5.4 Imunizações

Para a produção de anticorpos anti-DENV sorotipo específicos os animais foram imunizados 5 vezes por diferentes vias (intraperitoneal, subcutânea e intravenosa) com 1.0×10^6 ffu_{C6/36} das cepas de DENV representativas dos sorotipos -1, -2 e -3 seguindo o seguinte protocolo: dose 1= via I.P. (+ Adj. Freund); dose 2 = via S.C. (+ Alugel); dose 3 = vias I.P. (+ Alugel); dose 4 = via S.C. (+Alugel); dose 5 = via I.V. (sem adjuvante). O intervalo entre uma imunização e outra foi de uma semana. Adicionalmente, com o objetivo de obter anticorpos grupo-específico, isto é, capazes de reconhecer todos os três sorotipos do vírus da dengue, quatro animais foram imunizados com duas doses de cada cepa (DENV-1, -2 e -3) sempre utilizando a via intraperitoneal, contendo adjuvante de Freund na primeira dose e Alugel nas demais doses. O volume máximo administrado por animal foi de 200µL, considerando o imunógeno e o adjuvante.

Para a geração de anticorpos anti-rNH, quatro camundongos foram imunizados com 5 doses da rNH (50 µg/dose/animal) alternadas pela via intraperitoneal e sub-cutânea (a última dose foi administrada sem adjuvante pela via

intravenosa). Conforme o protocolo de imunização com o vírus da dengue, foi utilizado adjuvante completo de Freund na primeira dose e Alugel nas demais doses, obedecendo a intervalos de uma semana entre as imunizações. Antes das imunizações os animais foram sangrados pela via caudal para retirada de soro pré-imune (aproximadamente 50µl de sangue total/animal), que foi mantido por 1h em temperatura ambiente até sua coagulação e então centrifugado 3.000 rpm por 5 minutos para separação do soro. O soro foi armazenado a -20°C até sua utilização.

5.5 Produção e caracterização de anticorpos monoclonais

5.5.1 Retirada das amostras de baço e de soro pós-imune

Três dias após a última imunização os animais foram anestesiados com solução de anestésico e sedativo cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina (Vetaset®) na concentração de 100 mg/kg⁻¹ de ketamina; 1 mg/kg⁻¹ de xilazina, administrado em um volume de 0,1 ml/10 g de peso animal por via I.P. Após sinais visíveis de anestesia constatados por reflexo óculo motor e reação ao pinçamento das patas posteriores realizou-se o procedimento de punção cardíaca para a retirada do soro pós-imune (~de 1.2 ml /animal). Após esse procedimento, e ainda sob o efeito da solução anestésico-sedativa, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e transportados para o laboratório imersos em álcool 70%.

As amostras de sangue total obtidas foram centrifugadas por 5 min/3000 rpm para obtenção dos soros pós-ímenes utilizados como controles positivos nos testes de triagem, bem como, para se avaliar a soroconversão dos animais. O soro foi aliquoteado e armazenado a -70°C até sua utilização.

5.5.2 Processamento das células para fusão

O baço de cada animal foi retirado em fluxo laminar através de incisão cirúrgica e macerado em placa de petri contendo cerca de 5-10 ml de meio RPMI 1640 sem SFB (Gibco), com o auxílio de lâminas estéreis de ponta fosca. A suspensão de células resultante foi filtrada em ponteiras preenchidas com filtro de nylon. O material filtrado foi transferido para tubo cônico contendo 30 ml de meio RPMI sem soro e centrifugado a 1.500 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram recuperadas com 5 ml de solução de lise de hemácias

(168 mM de cloreto de amônio gelado) por 5 min no gelo. Após esse período, foram adicionados 45 ml de meio RPMI 1640 sem SFB e as amostras centrifugadas a 1.500 rpm por 10 min a 4 °C. Este procedimento foi realizado duas vezes para assegurar a retirada do cloreto de amônio da suspensão de linfócitos. A contagem celular foi realizada em câmara de *NeuBauer*.

As células mielômicas (células tumorais) murinas da linhagem Ag8xP3653 foram previamente crescidas em garrafas de cultivo de 75 cm² (Nunc, Roskilde, Denmark) contendo meio RPMI acrescido de 20% de SFB, conforme descrito acima. Após avaliação visual do crescimento celular estas células foram transferidas para tubos cônicos de 50 ml e centrifugas por 5 min a 2000 rpm em temperatura ambiente. As células foram recuperadas em 10 ml de meio RPMI sem SFB e contadas em câmara de *NeuBauer*.

5.5.3 Fusão celular

A fusão celular foi realizada conforme descrito por Earley & Osterling (1985). Os linfócitos murinos e as células mielômicas (proporção de cinco células de mieloma para um esplenócito) foram fusionadas com o auxílio do agente fusogênico PEG (50% v/v em meio RPMI sem SFB:polietilenoglicol). As células esplênicas foram misturadas com o mieloma (proporção de 5:1) e centrifugadas por 10 min., a 1.500 rpm, a 4°C Após o descarte do sobrenadante os sedimentos celulares foram recuperados lentamente com solução de PEG e meio RPMI sem SFB por 6 minutos (detalhes adicionais em anexo). Finalmente, as células foram centrifugadas para retirada do PEG (que é tóxico para as células) e recuperadas em meio RPMI com 20% de SFB (meio completo - ver acima) e 100 µL/orifício foram plaqueados em placas de 96 (Nunc) orifícios na concentração de 2.5×10^5 células/orifício.

5.5.4 Manutenção dos hibridomas

Posteriormente ao processo de fusão, as células híbridas foram mantidas por 24h em meio RPMI completo. A partir deste ponto foi adicionada ao meio a droga seletiva HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina) (Sigma, St. Louis, MO, USA) com o objetivo de selecionar apenas hibridomas formados por esplenócitos + mielomas. A cada 48h foi realizada a troca de meio da placa por meio novo (contendo HAT) até o 13º dias pós-fusão (dpf) visando a suplementação de nutrientes para a

manutenção das células. Após 12 dias de cultivo em meio HAT, a droga foi retirada lentamente, utilizando-se para isto o meio acrescido de HT (hipoxantina e timidina) (Sigma), por mais 4 dias, até a retirada completa da droga utilizada para a seleção dos clones. Quando se observou 75% de confluência celular, procedeu-se a triagem dos hibridomas.

5.5.5 Triagem dos hibridomas

Os hibridomas secretores de anticorpos anti-DENV-1, -2, -3 foram selecionados através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) em culturas de células C6/36 infectadas com cada uma das três distintas cepas de dengue. 1.0×10^5 células/orifício foram plaqueadas em placas de 96 orifícios e infectadas com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1 dos vírus DENV-1 (BR/MR-01), DENV -2 (EN-02), DENV -3 (BR DEN3 290-02) e mantidas por 72h em estufa a 28°C. Após a incubação as placas foram lavadas com tampão PBS 1x e fixadas/permeabilizadas com 100 µl de uma solução 1:1 de metanol:acetona (Merck) gelada. As placas foram mantidas a -20°C até sua utilização.

Para seleção dos hibridomas secretores de mAbs anti-rHN utilizou-se o kit IBMP HANTEC desenvolvido no Instituto Carlos Chagas (ICC) (Raboni et al., 2007). Brevemente, 100 µL dos sobrenadantes dos poços contendo híbrido a uma confluência de aproximadamente 75% foram incubados (1h a 37°C) em placas do tipo ELISA contendo a rNH absorvida na concentração de 4 µg/poço. Os controles negativos da reação foram tampão de diluição de amostras (PBS, 0.05% Tween 20 com 5% de leite em pó desnatado (Molico[®] - Nestlé) e o meio RPMI utilizado para manutenção dos hibridomas. Como controle positivo da reação foi utilizado soro de animais imunizados com rNH diluído em tampão de diluição de amostras (1:250). Após 6 lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo (PBS 1x com 0,05% Tween) conjugado com peroxidase. A reação foi visualizada pela adição de peroxidase diluída em tampão diluente na proporção de 1:1.200 (TMB/Peroxidase – KPL, Gaithersburg, MD, USA. Cat n. 53-00-03L). A densidade ótica foi determinada por um leitor automático de placas de Elisa na faixa de 450 nm. Densidades óticas acima de 0,200 foram assumidas como positivas. A isotipagem dos anticorpos foi realizada também por ensaio imunoenzimático utilizando o kit

comercial *SBA ClonotypingTM HRP System* (Southern Biotech), conforme descrito pelo fabricante.

5.5.6 Estabilização e clonagem dos hibridomas

Os clones com reação positiva nas técnicas de triagem descritas acima foram submetidos a dois ciclos sucessivos de congelamento (-20°C/2h; -70°C/2h e Ni²) e crescimento para selecionar apenas clones estáveis. O meio de congelamento foi composto por 7.5% de dimetilsulfóxido (DMSO –Hybrimax - Sigma, St. Louis, Mo, USA) e 92.5% de SFB. Após descongelamento as células foram retriadas e os poços positivos foram sub-clonados por diluição limitante em placas de 96 poços. Brevemente, adicionou-se 100µL/poço de meio RPMI acrescido de 20% de SFB em placas de 96 poços e 50 µL da suspensão celular foi distribuída seriadamente. As placas foram mantidas em estufa de CO₂ por 2h a 37°C para permitir adesão das células às placas. Após esse período procedeu-se observação das placas em microscópio ótico e poços contendo uma única célula foram expandidos.

5.5.7 Ensaios de caracterização dos anticorpos

5.5.7.1 Isotipagem

Os poços expandidos na etapa anterior foram retriados. Os sobrenadantes dos poços positivos foram utilizados para a isotipagem, visando confirmar a natureza clonal dos mesmos. A isotipagem foi realizada utilizando-se o kit *SBA ClonotypingTM HRP System* (Southern Biotech), baseado em ensaio em formato do tipo ELISA, seguindo o protocolo do fabricante.

5.5.7.2 Imunofluorescência Indireta

No caso dos mAbs anti-DENV, foi determinado a reatividade cruzada dos clones para os diferentes sorotipos através de ensaios de IFI. Para tanto, células C6/36 (1.0 x 10⁶ células/orifício) foram plaqueadas em placas de 8 orifícios do tipo LabTekTM e infectadas com MOI de 1 com as cepas de DENV-1, -2 ou -3 e incubadas por 72h a 37°C e 5% de CO₂. Após este período as placas foram fixadas/permeabilizadas com solução de metanol:acetona e marcadas com os sobrenadantes de cultura dos clones anti-DENV-1, -2 e -3. Cada mAb gerado foi testado contra as três cepas de DENV utilizadas no presente estudo. Os mAbs anti

rNH foram testados em lâminas de células Vero infectadas com vírus Maciel (cedidas pela Dra. Silvana Levis). Os núcleos das células C6/36 (ensaio de mAbs anti-dengue) e das células VERO (ensaios mAbs anti- rNH) foram marcadas com 10 μ L/poço da solução composta por 1 μ L de DAPI em 2000 μ L de PBS por 4 min em temperatura ambiente. Após lavagens dos poços adicionou-se 10 μ L de solução PBS/glicerol 10%. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência.

5.5.7.3 *Western blot*

Os ensaios de *western blot* foram realizados como previamente descrito (Laemmli & Favre, 1973). Brevemente, diferentes proteínas recombinantes dos vírus dengue produzidas no laboratório de Virologia Molecular do ICC, assim como marcadores de massa molecular foram fracionadas em géis de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS/ PAGE) em géis de 13% ou 15%. Os monoclonais 695/12C/2H, 512/10A/8A e 906/4H/9A, produzidos a partir de animais imunizados com a cepa de DENV- 1 BR/01-MR foram testados contra as proteínas NS3 (~58 kDa – fracionada em gel de 13%) e domínio B (~18 kDa - fracionada em gel de 15%), ambas clonadas DENV-1 e expressas em sistema procariótico. O anticorpos 658/9A, 646/9G, 332/2D, obtidos por imunização de animais com a cepa DENV-2 (EN-02) foram reagidos contra as proteínas NS1 (~45 kDa) e domínio B (~18 kDa), clonadas a partir de DENV-2 e expressadas em sistema procariótico. Os anticorpos 424/8G, 918/6A, 920/11C foram reagidos contra as proteínas prM/E (-65 kDa) clonada a partir de DENV-3 e expressada em sistema eucariótico de células de drosófila; e contra o domínio B da proteína de envelope (E dom B), obtido por clonagem a partir de DENV-3 e expressada em sistema procariótico. A proteína prM/E foi fracionada em gel de 13%. A proteína E dom B devido ao seu baixo peso molecular foi fracionada em gel de 15%. Os monoclonais anti-rNH foram reagidos contra rNH purificada fracionada em gel de 13%. As proteínas fracionadas foram transferidas (100 V por 2h a 4C°) para membranas de nitrocelulose e marcadas com os sobrenadantes de cultura dos hibridomas e controles (Tampão de diluição como controle negativo e anti-soro policlonal grupo específico diluído em tampão de diluição (1:250). As membranas foram bloqueadas com TBS com 5% de leite desnatado overnight a temperatura ambiente sob agitação constante para evitar reações inespecíficas. Após este período as membranas foram incubadas com o

sobrenadante puro dos hibridomas por 1 h. a 37C°, sob agitação constante. Em seguida procedeu-se com a lavagem das membranas com 20 mL da solução de TBS (3 lavagens de 5 min cada). As membranas foram contra marcadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Promega, Madison, WI, USA) diluído 1:7000 em TBS com 5% de leite em pó desnatado durante 1h em 37C°, sob agitação constante. Após esse período as membranas foram lavadas com TBS (3 lavagens de 5 min cada) e a reação foi visualizada após 15 min de incubação em temperatura ambiente com a solução composta por 33µL de *5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate* (BCIP - Promega, Madison, WI, USA) e 66 µL *nitrobluetetrazolium* (NBT – Promega, Madison, WI, USA) para cada 10 mL de Tampão fosfatase alcalina (Tris HCl p.H 9,5, NaCl, MgCl₂)

5.5.7.4 cinética de crescimento celular

Os mAbs anti-rNH foram caracterizados quanto ao seu crescimento e secreção de anticorpos através de ensaio de cinética. Para isto, 1.0×10^5 hibridomas foram plaqueados em placas de 6 orifícios (TPP. Cat. 92006) e o crescimento celular foi avaliado de forma cinética a cada 24h por 4 dias. Todos os experimentos dessa etapa foram realizados em triplicata. Nos mesmos pontos foi determinado o título de anticorpo secretado no sobrenadante utilizando-se o kit IBMP HANTEC com diluições seriadas de 1:10 - 1:160 para o ponto de 24h e diluições de 1:20 – 1:320 para o ponto de 48 h. No ponto de 72 h e 96 h as diluições foram 1:20 – 1:640 e 1:20 – 1:1,280, respectivamente. O desenvolvimento e visualização da reação de ELISA foram realizados conforme descrito anteriormente na etapa de triagem dos hibridomas (item 5.5.5). Para determinação dos títulos dos anticorpos em cada ponto assumiu-se D.O de 0,2 como linha de corte acrescido de 3 vezes o desvio padrão resultante da somatória das triplicatas.

5.5.7.5 Ensaios de Imunohistoquímica

O mAb anti- rNH 313/11E foi testado na técnica de imunohistoquímica utilizando corte de pulmão de um caso fatal de SCPH no estado do Mato Grosso, Brasil, ocorrido no ano de 2008. Os tecidos foram fixados em parafina, seccionados e marcados com os controles anticorpo monoclonal RAM 11 (anticorpo de coelho anti-macrófago – Dako, Glostrup, Denmark) (controle negativo 1) e anticorpo monoclonal flavivirus grupo-específico 4G2 (controle negativo 2). Imunoglobulinas de

cabra anti-camundongo e anti-coelho conjugadas com peroxidase em polímero de dextran foram usadas como anticorpo secundário (Envision+/Peroxidase, DaKoCytomation®). A reação foi revelada utilizando-se o *Liquid DAB* (DaKoCytomation®), e a recuperação do antígeno com o *ImmunoRetriever Bio SB® Kit*.

6. Resultados

6.1 Fusões para produção de mAbs anti-dengue e anti-rNH

As fusões de dengue geraram 960, 660 e 984 (2604 no total) poços para BR-01/MR, BR DEN2 EN-02 e BR DEN3-290-02, respectivamente. Foram triados 1100 (42 % do número total de poços gerados) poços por ensaio de imunofluorescência (IFA). Foram obtidos ao todo 131 clones de dengue positivos por IFI (11.9% do total de clones de triados, e 5% do total de clones gerados). Entre os clones positivos, foram obtidos 65 na fusão DENV-1 (BR/01-MR; 6.8%); 20 clones na fusão DENV-2 (BR DEN2 EN-02; 3.1%) e 60 clones da fusão DENV-3 (BR DEN3-290-02; 6.1%)

O protocolo de imunização combinada com os 3 sorotipos de DENV nos mesmos animais, na tentativa de gerar hibridomas secretores de anticorpos grupo-específico, gerou 228 poços, dos quais apenas 20 poços apresentaram crescimento celular favorável, sendo estes triados por IFI. Foram observados 14 poços positivos dos quais 1 cessou a secreção de anticorpo dentro de um período de 10 dias. Os 13 hibridomas restantes foram dirigidos contra células C6/36 e não contra o vírus (Tabela 6.1), demonstrando que a purificação viral por gradiente de sacarose não é 100% pura.

O protocolo de fusão para a rNH gerou 440 clones, dos quais 352 foram triados por ensaio imunoenzimático do tipo ELISA (80% do número total de poços gerados). Do total de poços/clones testados, 174 mostraram positivos (isto é, com D.O. maior que 0.200), ou seja, 49% do total de clones triados.

Tabela 6.1 Resumo das fusões anti-DENV-1, -2, -3, DENV grupo-específico e anti-rNP de ARAUV

Antígeno	Cepa utilizada na imunização	Número de animais	Número de poços/clones gerados	Hibridomas triados	Hibridomas positivos	% de clones gerados/+ e de triados/+
DENV-1	BR/01-MR	4	960	551	67	6.9% - 12.1%
DENV-2	BR DEN2 EN-02	4	660	377	20	3.1 – 5.3%
DENV-3	BR DEN3 290-02	4	984	385	60	6.1% - 15.6%
DENV-1, -2 e -3	BR/01-MR, BR DEN2 EN-02, BR DEN3 290-02	2	228	14	0	0.4% - 7.1%
Hantavírus	recNP	4	440	352	174	39.5% - 49.4%
Total	-	18	3.272	1.679	306	9.4% - 18.2%

6.2 Estabilização e caracterização dos anticorpos anti-rNH

Entre os clones obtidos a partir da imunização com a rNH, 20 foram selecionados para estabilização por ciclos de congelamento e descongelamento, os demais 154 foram congelados após expansão em cultivo para análise futura. Dos 20 clones selecionados apenas 9 clones permaneceram positivos e foram submetidos à etapa de diluição limitante, gerando os subclones: 350/8C, 581/8G, 475/8A, 313/11E, 432/6BF, 305/5A, 572/7A, 664/10G, 651/6G, os quais se mantiveram positivos no ensaio ELISA. Estes clones foram então submetidos a isotipagem, conforme descrito em Materiais e Métodos (5.5.7.1). Todos os 9 clones apresentaram cadeia leve do tipo κ . O anticorpo 572/7A pertencia a classe IgG2b, e o anticorpo 664/6G foi classificado como IgM. Todos os demais mAbs foram classificados como IgG1 (ver tabela 6.2).

Tabela 6.2 Clonagem e isotipagem dos anticorpos anti-rNH

Nome do Clone	Ciclos de diluição limitante	Isotipo- Cadeia pesada	Isotipo -Cadeia leve
475/8A	1	IgG1	κ
350/8C	1	IgG1	κ
581/8G	1	IgG1	κ
651/6G	1	IgG1	κ
313/11E	1	IgG1	κ
432/6BF	2	IgG1	κ
305/5A	1	IgG1	κ
572/7A	1	IgG2b	κ
664/10G	1	IgM	κ

A especificidade desses subclones para a rNH foi avaliada por ensaios de *western blotting* contra a proteína recombinante purificada, a mesma utilizada para a imunização dos animais (figura 6.3). Este ensaio foi realizado visando determinar se a reatividade dos clones seria para a rNH ou algum contaminante presente na amostra capaz de gerar resposta em camundongos. Como controle foi utilizado extrato de *Escherichia coli*. Os ensaios de *western blotting* confirmaram a especificidade dos respectivos clones para a rNH e demonstraram que a proteína recombinante rNH apresenta um padrão de multibandas no ensaio, o que pode ser evidenciado pelo padrão de várias bandas de tamanho menor que 48kDa, específica da rNH, e confirmado pela marcação com anticorpo anti-histidina (colunas 5 e 6 da figura 6.3). O soro pré-imune dos animais utilizados para imunização não se mostraram reativos contra a proteína, fato que já havia sido observado no ensaio de ELISA, e que demonstra claramente que os animais utilizados não tiveram contato prévio com a rNH, nem possuíam anticorpos que reagiam de forma cruzada com esta proteína. Como esperado, o controle negativo, o mAb 4G2, não foi reativo com a proteína rNH, bem como para o extrato de *E.coli* (colunas 9 e10 da figura 6.3).

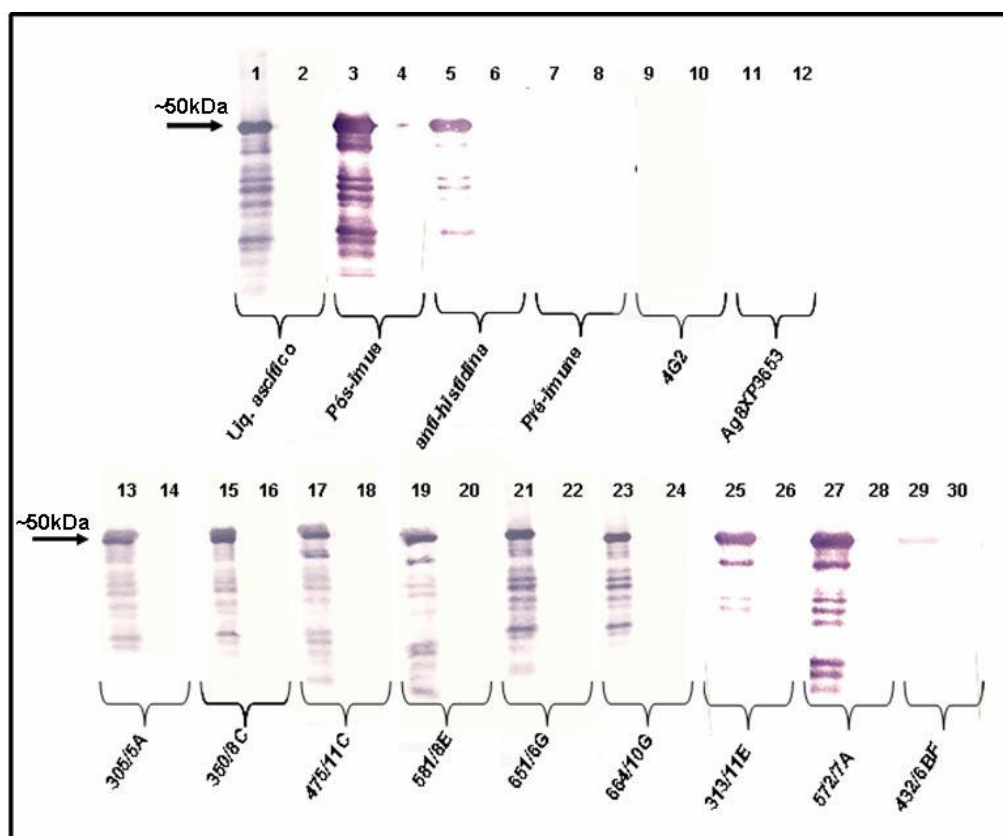
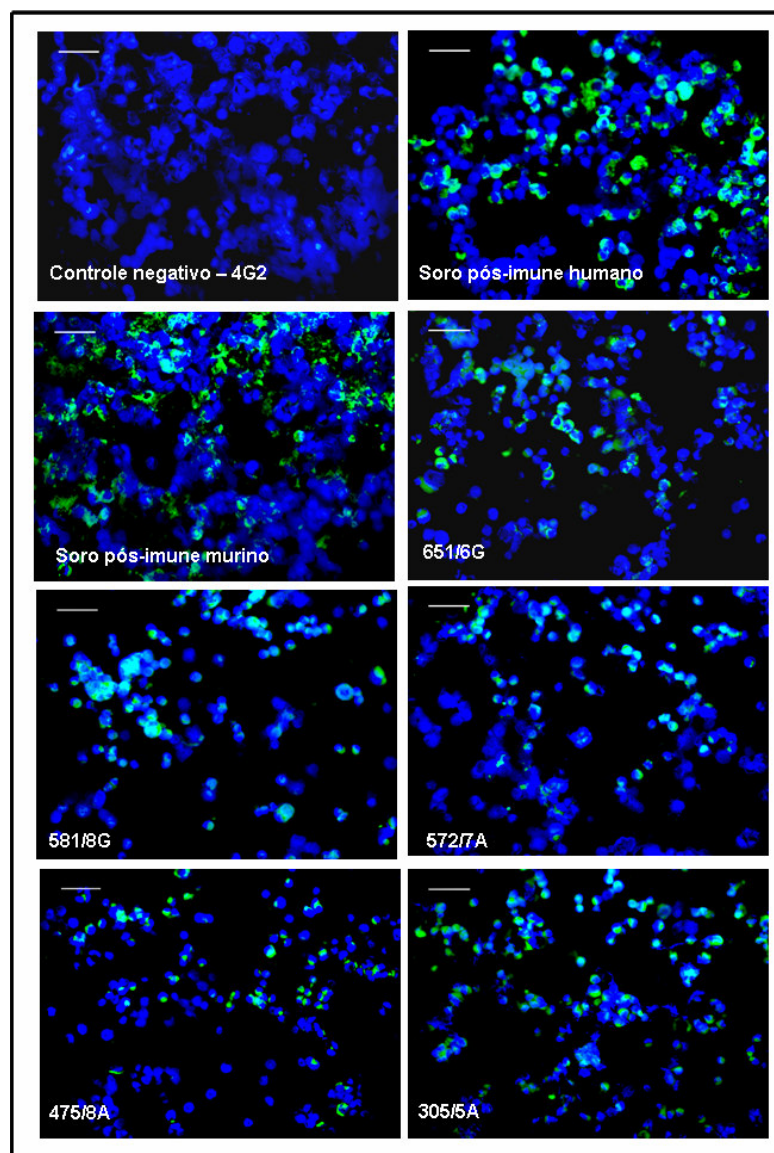


Figura 6.3 Resultado dos ensaios de *western blotting* com os 9 mAbs anti-rNH estáveis foram isotipados. Os números ímpares representam amostras da rNH e os números pares extrato de *E. coli*, utilizada para se avaliar a especificidade dos mAbs anti-rNH. 1 e 2: líquido ascítico de animais imunizados com rNH (diluição 1:250); 3 e 4: pós imune dos animais imunizados (diluição 1:250); 5 e 6: anticorpo monoclonal anti-histidina (1:5000); 7 e 8: soro pré imune dos animais (1:250); 9 e 10: mAb flavívirus específico 4G2 (controle negativo); 11 e 12: sobrenadante do mieloma Ag8XP3653; 13 e 14: clone 305/5A; 15 e 16: clone 350/8C; 17 e 18: clone 475/11C; 19 e 20: clone 581/8E; 21 e 22: clone 651/6G; 23 e 24: clone 664/10G; 25 e 26: clone 313/11E; 27 e 28: clone 572/7A; 29 e 30: clone 432/6BF.

Adicionalmente, avaliou-se a especificidade dos mAbs anti-rNH gerados em ensaio de Imunofluorescência direta utilizando lâminas contendo células Vero E6 infectadas com a cepa de hantavírus Maciel, gentilmente cedidas pela Dra. Silvana Levis, do Departamento de Investigación do Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio Maiztegui, Pergamino, Argentina. As lâminas foram marcadas com cada um dos 9 mAbs desenvolvidos contra rNP, e posteriormente com anticorpos secundário anti-IgG de camundongo conjugado com a molécula fluorescente FITC (Sigma) diluído 1:100 em PBS. Os controles positivos utilizados foram soro pós-imune dos camundongos imunizados para gerar os mAbs e soro de paciente humano positivo para hantavírus obtido do banco de amostras do

ICC/Fiocruz. Como controle negativo foi utilizado o anticorpo monoclonal 4G2, flavivírus-específico.

Os resultados mostram claramente que todos os mAbs desenvolvidos reagem de maneira específica contra a rNH, apesar de apresentarem reação menos intensa que os controles positivos utilizados. Além disso, o sinal de fluorescência foi observado intensamente na região peri-nuclear (Figura 6.4)



Continua na próxima página

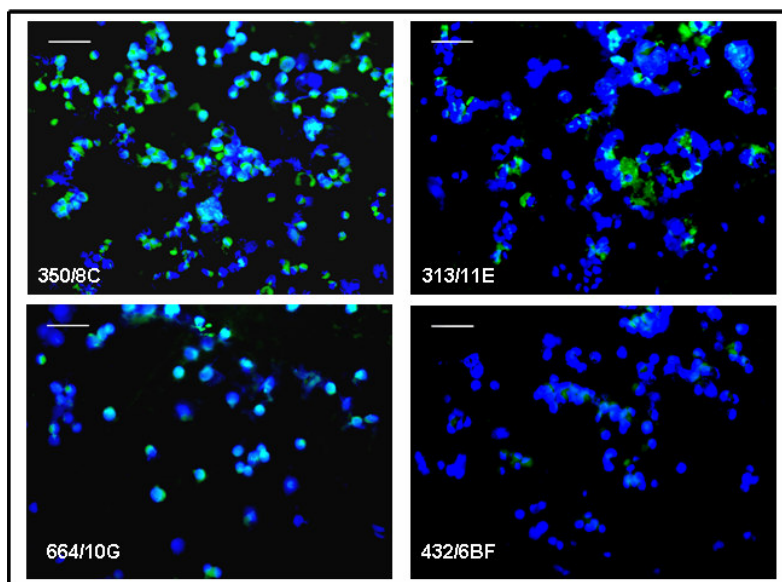


Figura 6.4 Ensaio de imunofluorescência em células Vero E6 infectadas com o hantavírus Maciel gentilmente cedidas pela Dra. Silvana Levis. As células foram incubadas primeiramente com os diferentes mAbs anti-rNH gerados, e em seguida com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com FITC. Como controle negativo foi utilizado o anticorpo monoclonal flavivírus específico 4G2. As barras representam 40µm. As fotos foram feitas em um NIKON ECLIPSE E600 (Nikon, Inc., Melville, NY) com o software Image-Pro Plus versão 4.5 (MediaCybernetics, Bethesda MD).

Adicionalmente, avaliou-se a utilização do mAb anti-rNH 313/11E pela técnica de imunohistoquímica em lâminas contendo cortes de tecido pulmonar de um caso fatal de SCPH. Mais uma vez os resultados mostraram a especificidade e aplicabilidade dos mAbs anti-rNH na detecção da infecção por hantavírus em tecidos humanos (Figura 6.5, B e D). Os resultados obtidos demonstram que o mAb 313/11E apresentou reação específica a antígenos virais presentes no tecido pulmonar pós morte de um paciente com SCPH, evidenciando em especial as células mononucleares (por exemplo, macrófagos alveolares) e as células do endotélio pulmonar de maneira bastante específica quando comparado aos ensaios com o anticorpo controle negativo 4G2 (Figura 6.5, C e D).

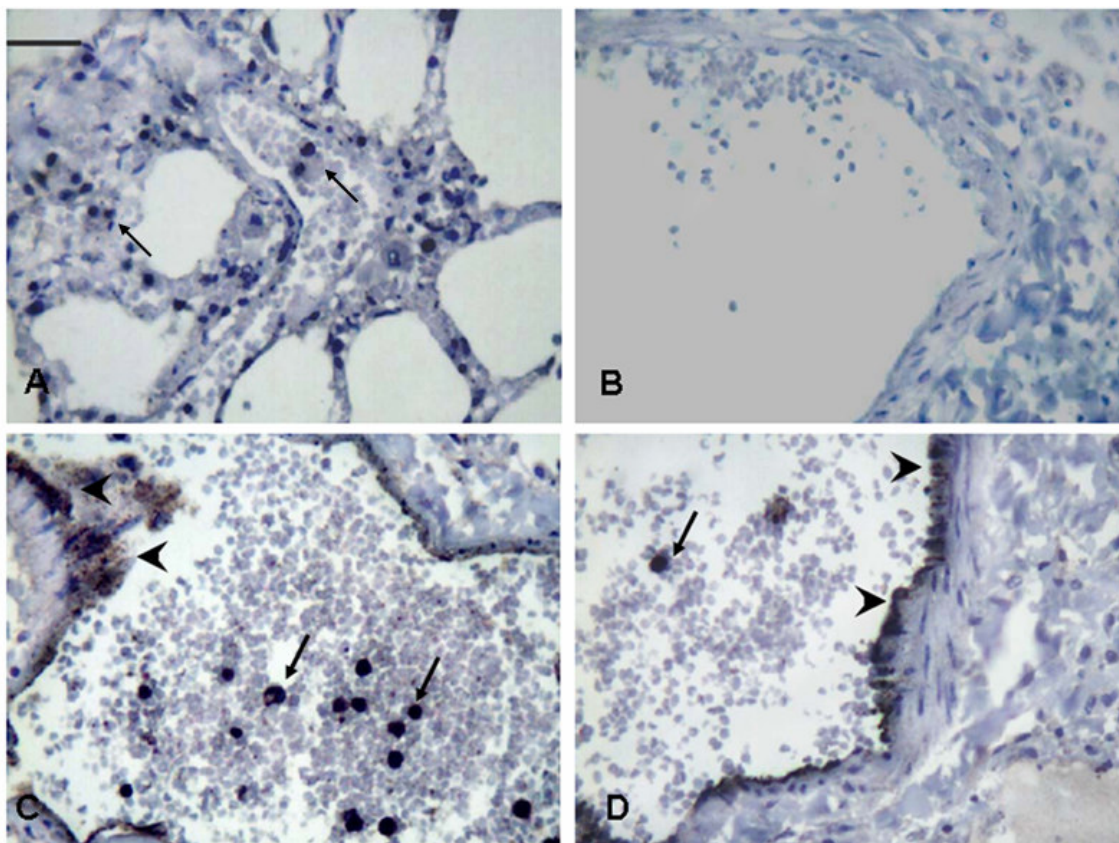
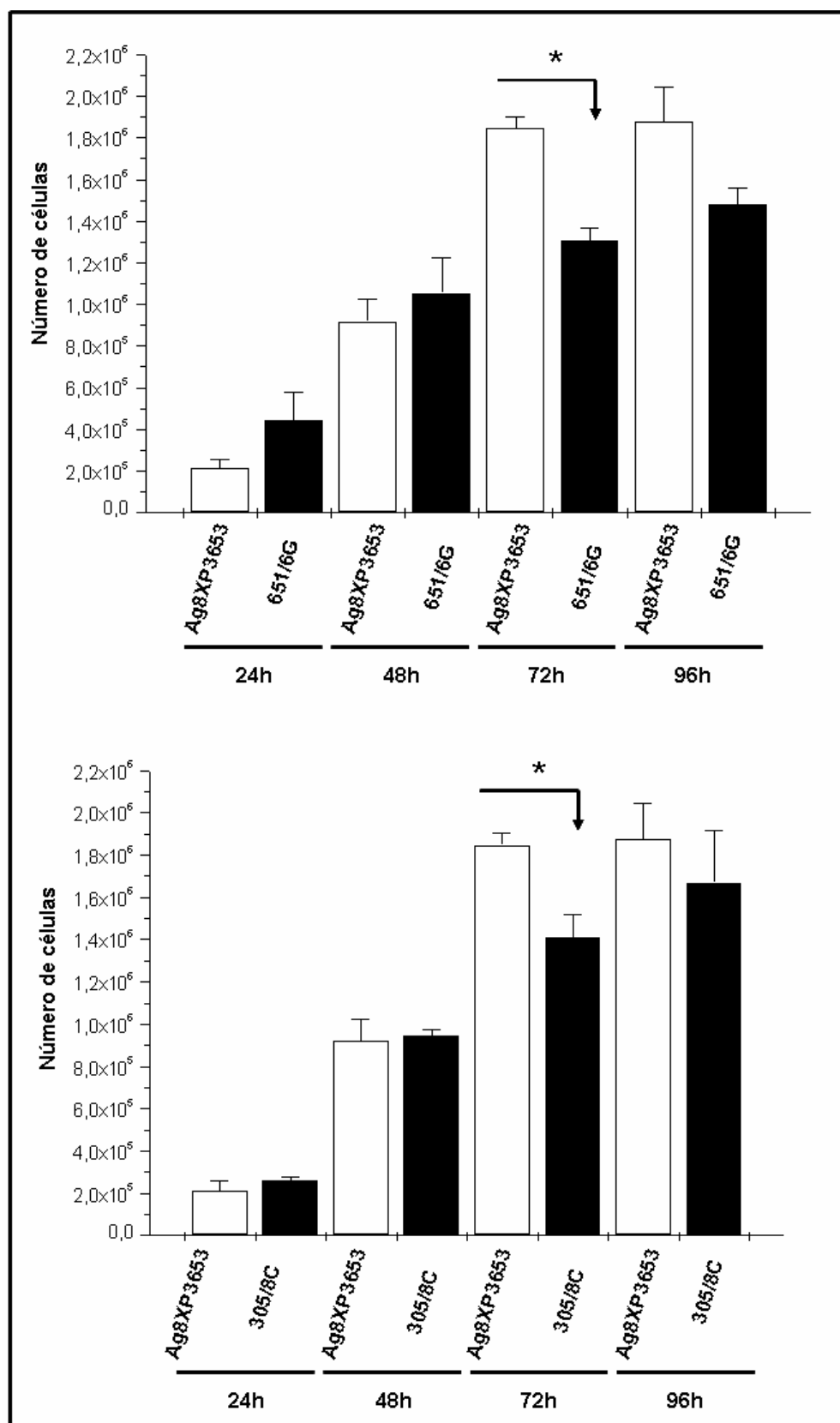


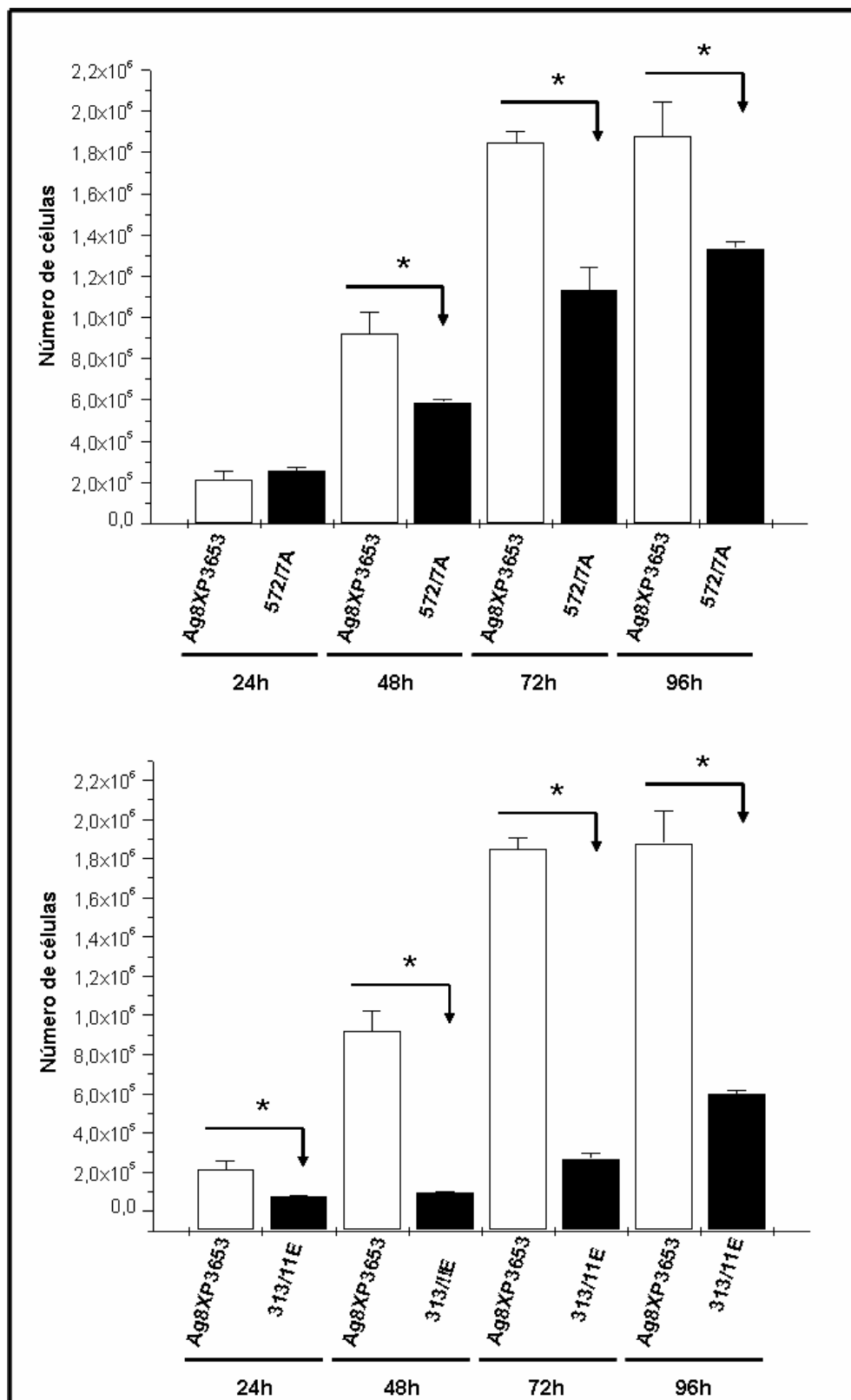
Figura 6.5 Imunohistoquímica do tecido pulmonar de um caso fatal de hantavirose. Os controles isotípicos utilizados foram: A) corte de pulmão marcado com RAM 11 (anticorpo de coelho anti-macrófago) e B) corte de pulmão marcado de o anticorpo flavivirus grupo-específico 4G2. A marcação com o mAb anti-rNH 313/11E demonstrou que os principais alvos-celulares na SCPH neste caso clínico foram as células epiteliais (pontas de seta) e infiltrado de células mononucleares (setas) (C e D). As lâminas foram incubadas com os diferentes anticorpos citados anteriormente. Em seguida, foram marcadas com o anticorpo secundário de cabra anti-camundongo (ou anti-coelho) conjugado com peroxidase em polímero de dextran (Envision+/Peroxidase, DaKoCytomation®). A reação foi revelada utilizando-se o *Liquid DAB* (DaKoCytomation®), e a recuperação do antígeno com o *ImmunoRetriever Bio SB® Kit*. Cabeça de setas indicam tecido endotelial pulmonar com presença de antígenos virais. Setas indicam a marcação de células mononucleares infectadas com hantavirus. As imagens foram realizadas em microscópio Olympus BX 50 com o software Image-Pro® Plus versão 4.5 (Maryland). A barra localizada no canto superior esquerdo da figura A corresponde a 200μm.

Finalmente, foi realizada a cinética de crescimento dos clones (com exceção do clone 664/10G por ser do isotipo IgM) e a taxa de secreção de anticorpos dos mesmos, em relação ao mieloma Ag8XP3653 foi analisada. Estes experimentos visaram determinar quais os clones que apresentavam altas taxas de crescimento celular e concomitante com a secreção de anticorpos, o que poderia ser útil em termos de produção destes anticorpos em larga escala (Figura 6.6 e Figura 6.7). As cinéticas de crescimento dos hibridomas 475/8A, 331/11E e 581/8G foram significativamente diferentes, em todos os tempos, quando comparadas à cinética de

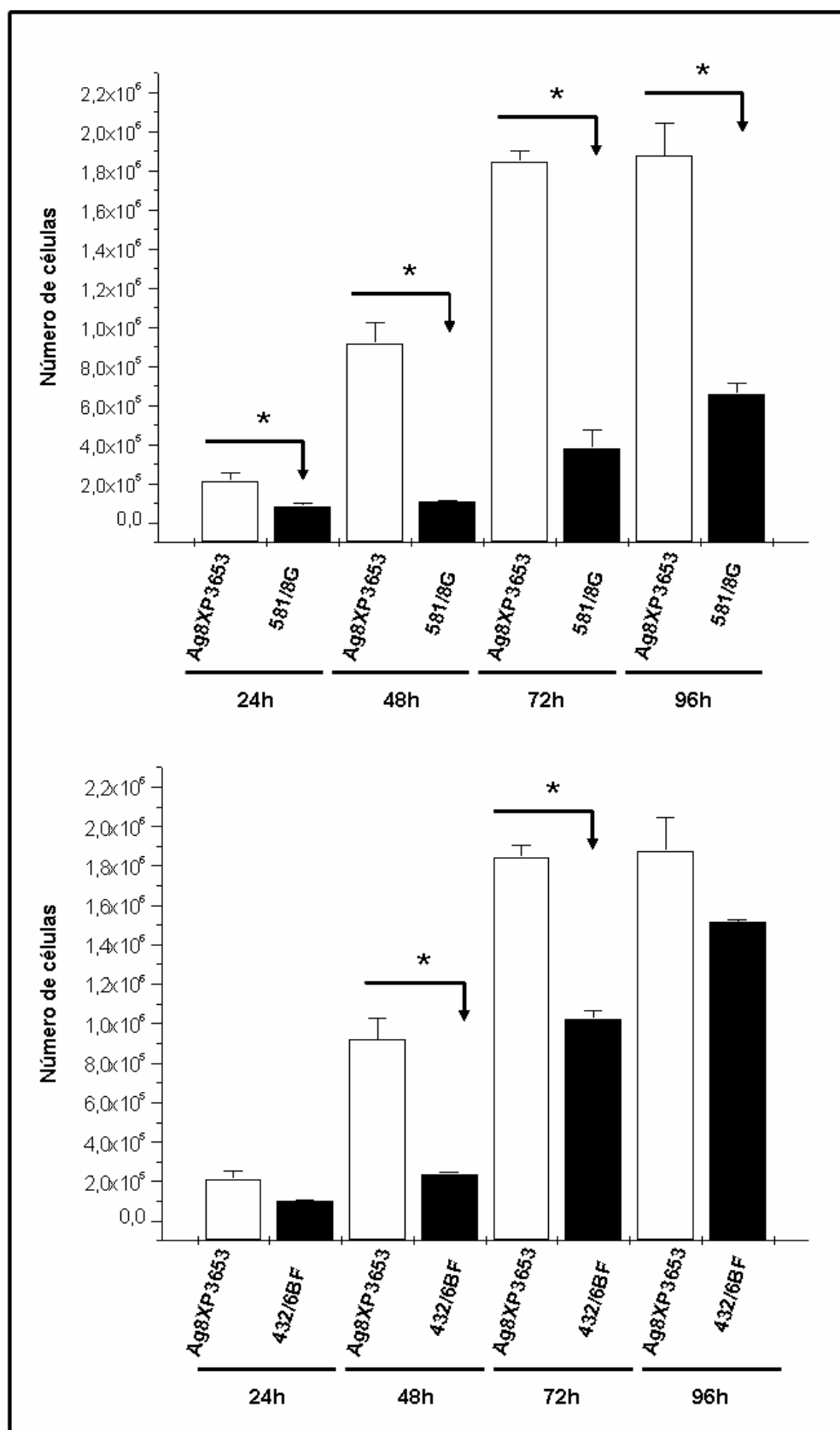
crescimento da célula controle, o mieloma Ag8XP3653. O mesmo resultado foi observado com os clones 651/6G e 305/8C no tempo de 72 h. O clone 432/6BF foi significativamente diferente do controle nos tempos de 48 e 72h enquanto o clone 572/7A foi estatisticamente diferente do controle nos tempos de 48, 72 e 96 h (FIGURA 6.6).



Continua na próxima página



Continua na próxima página



Continua na próxima página

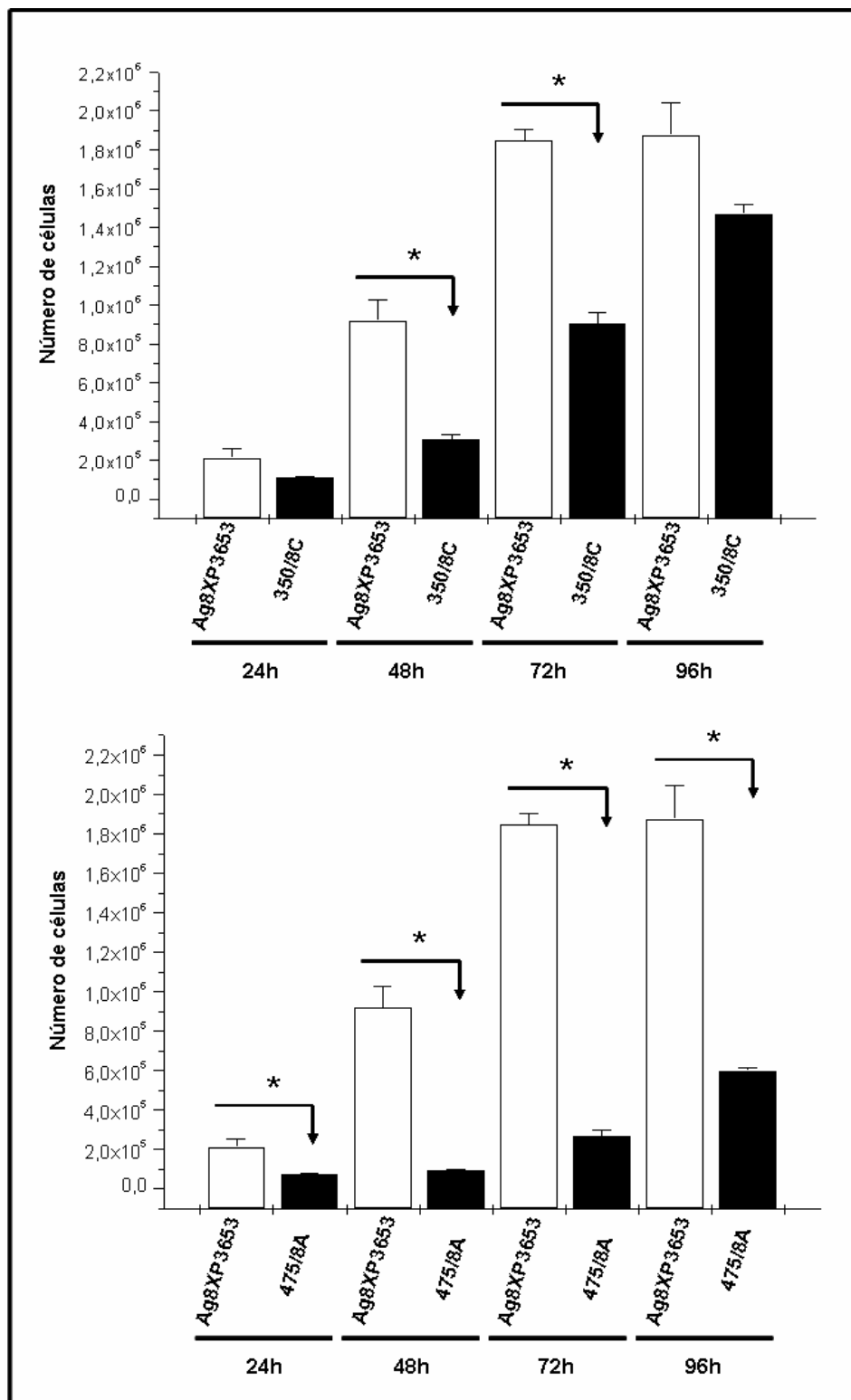


Figura 6.6 Crescimento celular dos hibridomas secretores de anticorpos anti-rNH comparado ao do mieloma Ag8XP3653 utilizado na fusão celular. Os pontos marcados com asterisco (*) representam diferenças estatisticamente significantes com valor de p menor que 0,01. O clone 664/10G não foi incluindo na análise.

Com relação ao ensaio de cinética de secreção de anticorpos, conforme esperado, a célula mielômica utilizada no processo de produção dos hibridomas não apresentou secreção em nenhum dos tempos da cinética avaliados. Os hibridomas 664/10G (amarelo); 305/5a (vermelho); 350/8C (verde) e 651/6G (azul claro) apresentaram secreção basal próximo de zero em todos os pontos avaliados, isto é, só apresentaram reação positiva quando testados puros, sem diluição, em todos os pontos avaliados. Por outro lado, os clones 313/11E (amarelo claro); 475/8A (preto); 581/8G (cinza claro) e 572/7A (branco) mostraram secreção de anticorpos superior aos demais já no ponto de 24 h. Com o passar do tempo as taxas de secreção de anticorpos aumentaram gradativamente, chegando a atingir D.Os (450nm) de magnitude de 1250 e 2500 no ponto de 96h, como no caso do clone 581/8G e 572/7A, respectivamente.

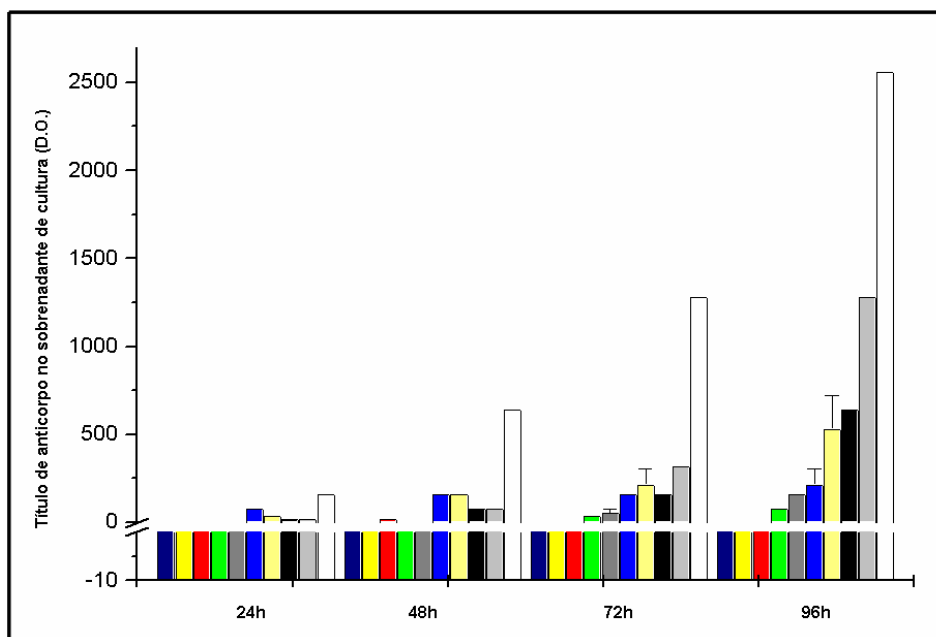


Figura 6.7 Títulos dos anticorpos no sobrenadante de cultura dos hibridomas anti-rNH. O título foi determinado por ensaio do tipo ELISA (IBMP HANTEC EIE) através de diluições seriadas seguindo-se as recomendações do fabricante quanto à determinação do último ponto positivo (D.O. > que 0.200). Todos os resultados foram obtidos de ensaios em triplicatas. O título foi definido como a diluição com D.O. superior à média do último positivo acrescido de 3x o desvio padrão. Mieloma Ag8XP3653 (azul escuro) e hibridomas: 664/10G (amarelo); 305/5A (vermelho); 350/8C (verde); 432/6BF (cinza escuro); 651/6G (azul claro); 313/11E (amarelo claro); 475/8A (preto); 581/8G (cinza claro) e 572/7A (branco). Os clones com D.O. próximo à zero não significam clones negativos, pois quando os sobrenadantes puros foram avaliados por ELISA, foi constatado a secreção de anticorpos específicos contra rNH.

6.3 Estabilização e caracterização dos anticorpos anti-DENV

Dentre os 147 clones obtidos nas fusões com DENV-1, -2 e -3 (Tabela 6.1), cinquenta e cinco foram escolhidos aleatoriamente (20 clones de DENV-1; 20 clones de DENV-2; 15 clones de DENV-3) e submetidos à ciclos de estabilização por congelamento e descongelamento, dos quais apenas 9 se mantiveram positivos. Dentre os nove positivos, 3 foram produzidos contra a cepa BR/01-MR, 3 contra a cepa BR DEN2 EN-02 e apenas 1 contra a cepa BR DEN3 290-02. Deste modo, recuperamos mais 2 clones adicionais dirigidos contra a cepa de DENV-3 e incluímos na análise, totalizando a caracterização de 9 clones anti-DENV. Todos os demais 92 clones foram congelados para análise futura.

Desta forma, os 9 clones estabilizados e ainda positivos por ensaio de IFI foram então submetidos à diluição limitante para seleção monoclonal. Após 1-3 ciclos de diluição limitante foram gerados três sub- clones obtidos à partir da imunização com a cepa BR/01-MR (695/12C/2H, 512/10A/8A, 906/4H/9A); 3 sub-clones obtidos com a imunização da cepa BR DEN2 EN-02 (658/9A, 646/9G, 332/2D); e 3 sub-clones à partir da imunização com a cepa BR DEN3 290-02 (424/8G, 918/6A e 920/11C) (Tabela 6.3). Interessantemente, os clones anti-DENV-3 918/6A e 920/11C, mesmo após três ciclos de diluição limitante e da repetição da técnica de isotipagem, continuaram mostrando mistura de dois isotipos distintos, IgG2b e IgG3. O anticorpo comercial 4G2 utilizado como controle, tanto nas reações de IFI, como no processo de isotipagem também foi caracterizado por Johnson et al., (2000) como uma mistura dos isotipos IgG1 e IgG2a.

Tabela 6.3: Clonagem e isotipagem dos anticorpos anti-DENV

Nome do clone	Sorotipo utilizado na imunização	Ciclos de diluição limitante	Isotipo - Cadeia pesada	Isotipo - cadeia leve
695/12C/2H	DENV-1	2	IgG1	κ
512/10A/8A	DENV-1	2	IgG2b	κ
906/4H/9A	DENV-1	2	IgG2a	κ
646/9G	DENV-2	1	IgG2a	κ
332/2D	DENV-2	1	IgG2a	κ
658/9A	DENV-2	1	IgG2a	κ
424/8G	DENV-3	1	IgG2b	κ
918/6A	DENV-3	3	IgG2b + IgG3	κ
920/11C	DENV-3	3	IgG2b + IgG3	κ
4G2*	DENV-2 NGC	-	IgG2a + IgG1	κ

*Clone obtido por Henchal et al. (1982).

A reatividade cruzada dos anticorpos anti-dengue gerados no presente estudo foi avaliada através de ensaio de IFI onde cada monoclonal gerado foi testado contra as 3 diferentes cepas de DENV utilizadas no estudo (BR/01-MR, BR DEN2 EN-02 e BR DEN3 290-02). Como controle utilizou-se o anticorpo monoclonal flavivírus-específico 4G2 desenvolvido por Henchal et al. (1982), que é capaz de reconhecer os quatro sorotipos do vírus da dengue (Figura 6.8).

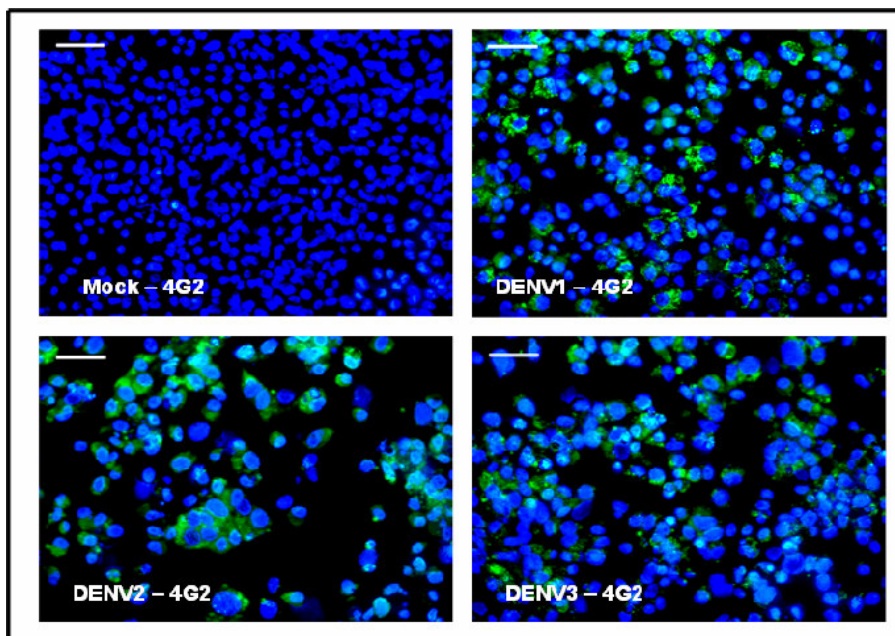


Figura 6.8: Ensaio de imunofluorescência em células C6/36 infectadas com MOI de 1 por 72h com as cepas de DENV-1, -2 e -3 utilizadas para o desenvolvimento dos mAbs e marcadas com o anticorpo monoclonal flavivírus-específico 4G2 (Henchal et. 1982), e com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com FITC. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI na diluição de 1:2000 em PBS. As barras representam 40 μ m. As fotos foram feitas em um NIKON ECLIPSE E600 (Nikon, Inc., Melville, NY) com o software Image-Pro Plus versão 4.5 (MediaCybernetics, Bethesda MD) com aumento de 40 X.

Os anticorpos obtidos à partir da imunização com a cepa DEN1 BR-01/MR (695/12C/2H, 512/10A/8A, 906/4H/9A) mostraram reatividade cruzada com os três sorotipos do vírus da dengue utilizados no presente trabalho (DENV-1, -2 e -3; Figura 6.9). Observe que em todos os casos a fluorescência localiza-se na região perinuclear da célula.

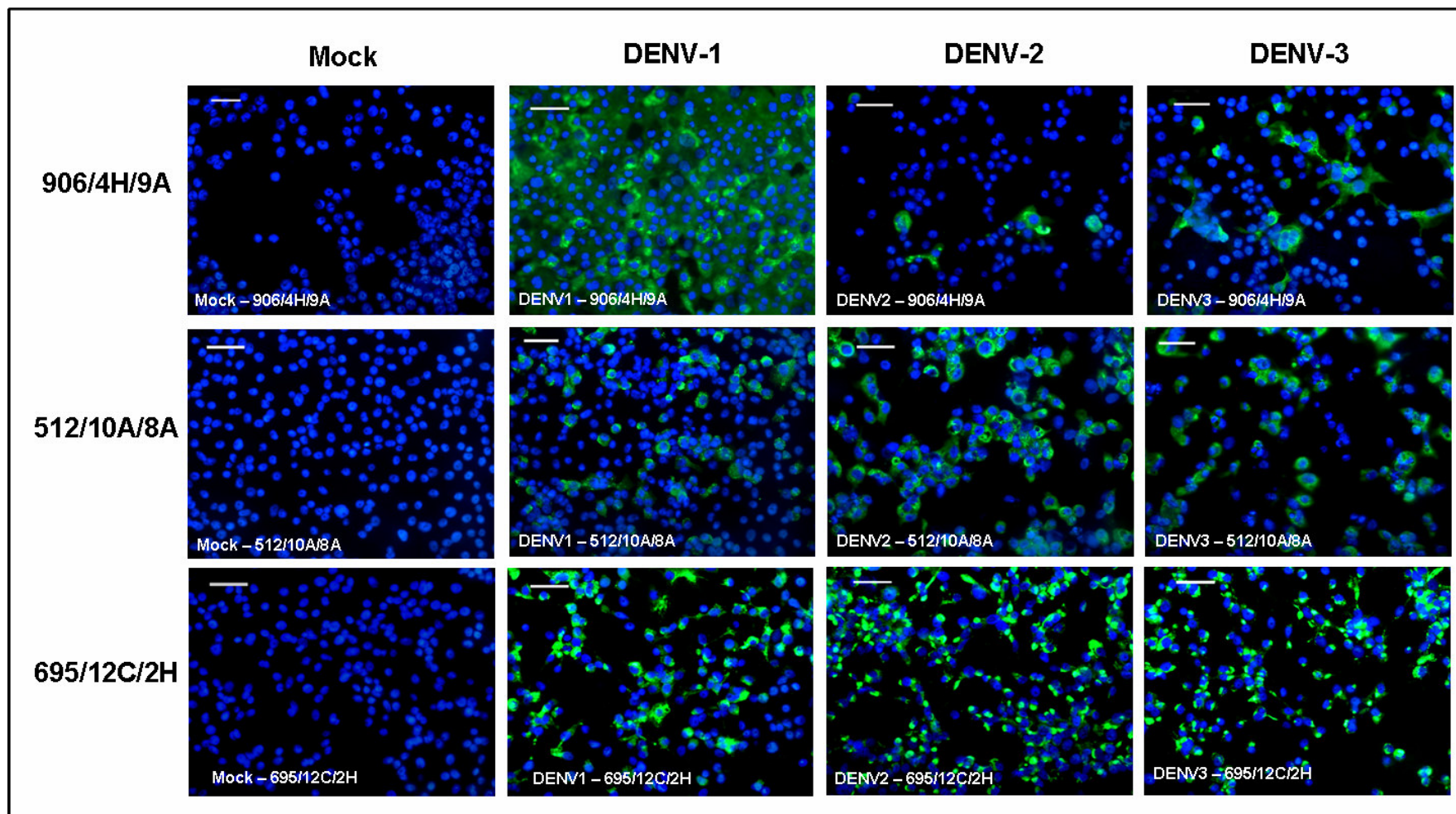


Figura 6.9 Padrão de imunofluorescência obtido com os mAbs gerados com a cepa de DENV-1 BR-01/MR reagido contra as cepas de DENV-1, -2 e -3. As amostras foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com FITC. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotos foram feitas em um NIKON ECLIPSE E600 (Nikon, Inc., Melville, NY) com o software Image-Pro Plus versão 4.5 (MediaCybernetics, Bethesda MD) com aumento de 40 X. As barras representam 40µm.

Contrariamente, os anticorpos monoclonais obtidos a partir da imunização com a cepa de DEN2 EN-02, mostraram-se específicas para este sorotipo, sem reatividade cruzada para as cepas de DENV-1 e -3 utilizadas neste trabalho (Figura 6.10).

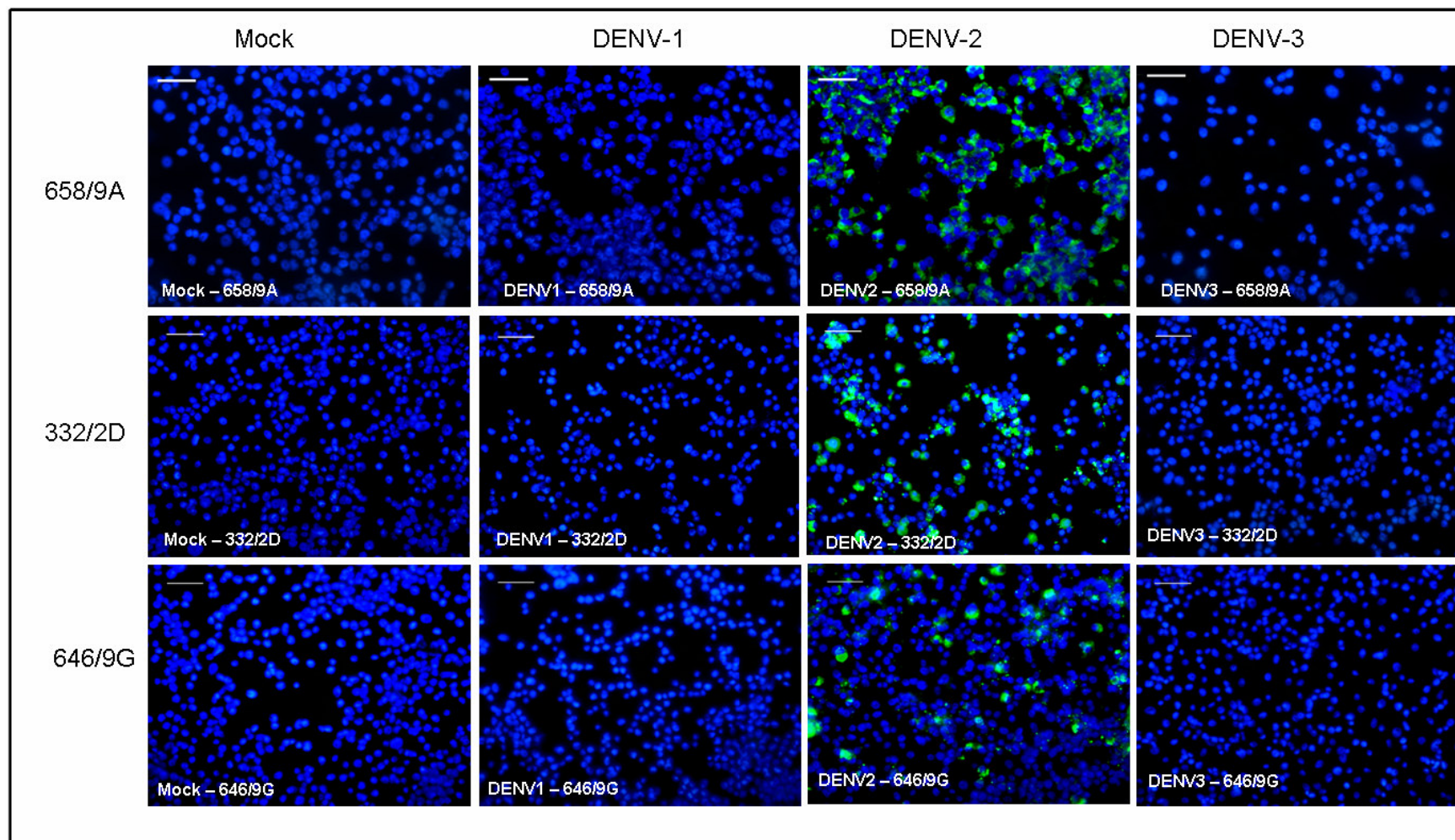


Figura 6.10 Padrão de imunofluorescência obtido com os clones de hibridomas gerados com a cepa de DEN-2 contra as cepas de DEN-1, -2 e -3. As amostras foram contra-marcadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com FITC. As fotos foram feitas em um NIKON ECLIPSE E600 (Nikon, Inc., Melville, NY) com o software Image-Pro Plus versão 4.5 (MediaCybernetics, Bethesda MD). As barras representam 40µm.

Os anticorpos gerados contra a cepa de DEN-3 (424/8G, 918/6A e 920/11C) mostraram reatividade cruzada para todas as 3 cepas de DENV utilizadas no presente trabalho. Desta forma, diferentemente do obtido para os clones de DEN-2, não se detectou nenhum clone específico para DEN-3 (Figura 6.11). O padrão de reatividade cruzada dos 9 hibridomas secretores de mAbs contra DEN-1, -2 e -3 encontra-se resumido na tabela 6.4.

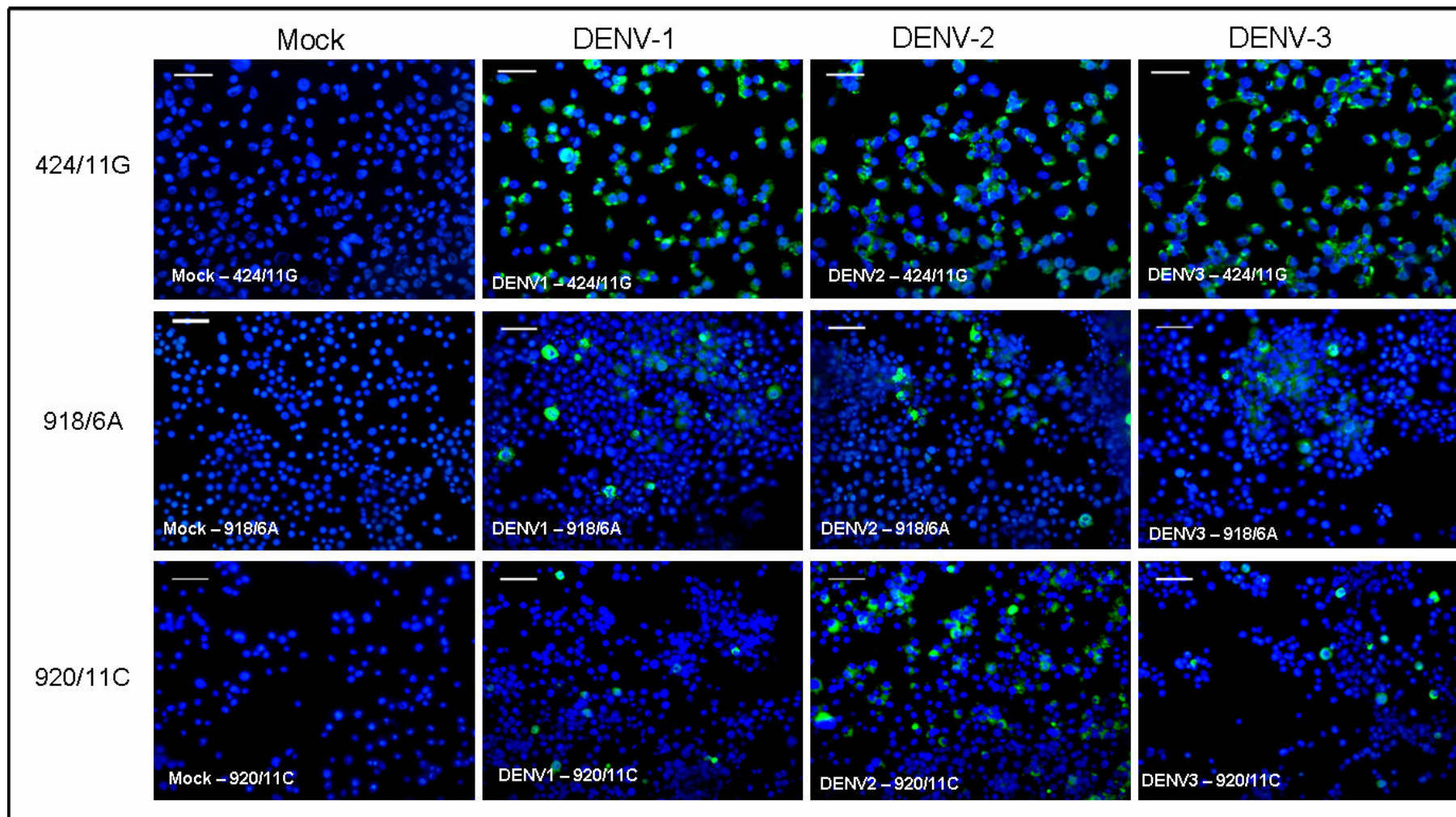


Figura 6.11 Padrão de imunofluorescência obtido com os clones de hibridomas gerados com a cepa de DENV-3 424/11G, 918/6A e 920/11C contra as cepas de DENV-1, -2 e -3. As amostras foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com FITC. As fotos foram feitas em um NIKON ECLIPSE E600 (Nikon, Inc., Melville, NY) com o software Image-Pro Plus versão 4.5 (MediaCybernetics, Bethesda MD). As barras representam 40µm.

Tabela 6.4: Padrão de reatividade cruzada e isotipo dos clones anti-dengue

Nome do clone	Sorotipo utilizado na imunização	Reatividade contra		
		DENV-1	DENV-2	DENV-3
695/12C/2H	DENV-1	+	+	+
512/10A/8A	DENV-1	+	+	+
906/4H/9A	DENV-1	+	+	+
646/9G	DENV-2	-	+	-
332/2D	DENV-2	-	+	-
658/9A	DENV-2	-	+	-
424/8G	DENV-3	+	+	+
918/6A	DENV-3	+	+	+
920/11C	DENV-3	+	+	+
4G2*	DENV-2 NGC	+	+	+

*Clone obtido por Henchal et al. (1982).

Finalmente, na tentativa de se definir os alvos-protéicos dos anticorpos produzidos, foram realizados ensaios de *western blot*. Para tanto foram utilizadas as seguintes proteínas recombinantes: domínio B da proteína de Envelope – E dom B - de DENV-1, -2 e -3 (~18 kDa), NS1 de DENV-2 (~ 45 kDa), NS3 (domínio helicase) de DENV-1 (~ 58 kDa) e a quimera prM/E de DENV-3 (~ 65 kDa), produzidas no laboratório de Virologia Molecular do ICC. Com exceção da proteína prM/E de DENV-3 que foi expressa em sistema eucariótico (células S2 de *Drosophila melanogaster*, Invitrogen Inc.), todas as demais proteínas foram expressas em sistema procariótico, utilizando *E. coli*.

Deste modo, os monoclonais 695/12C/2H, 512/10A/8A e 906/4H/9A, produzidos a partir de animais imunizados com a cepa de DENV-1 BR/01-MR foram testados contra as proteínas NS3 e E dom B de DENV-1. Porém, não foi observada nenhuma reação destes anticorpos com tais proteínas (Figura 6.12 A e B). O anticorpos 658/9A, 646/9G, 332/2D, obtidos por imunização de animais com a cepa DENV-2 (EN-02) foram testados contra as proteínas NS1 e E dom B de DENV-2. Destes anticorpos nenhum reconheceu a proteínas NS1 (Figura 6.12 D). Os anticorpos 658/9A e 646/9G também não foram capazes de reconhecer E dom B (Figura 6.12 - C). Por outro lado, o alvo-protéica do anticorpo 332/2D foi definido

com sendo o domínio B da proteína de envelope viral, como pode ser observado na reação de *western blot* (Figura 6.12 - C). Finalmente, os anticorpos 424/8G, 918/6A, 920/11C, obtidos de animais imunizados com a cepa BR DEN3-290-02, foram testados contra as proteínas prM/E e contra E dom B de DENV-3. Destes anticorpos nenhum foi capaz de reconhecer E dom B (Figura 6.12 E), ao passo que o anticorpo 424/8G, embora tenha reagido fracamente, foi capaz de reconhecer de modo específico a proteína prM/E (Figura 6.12 F).

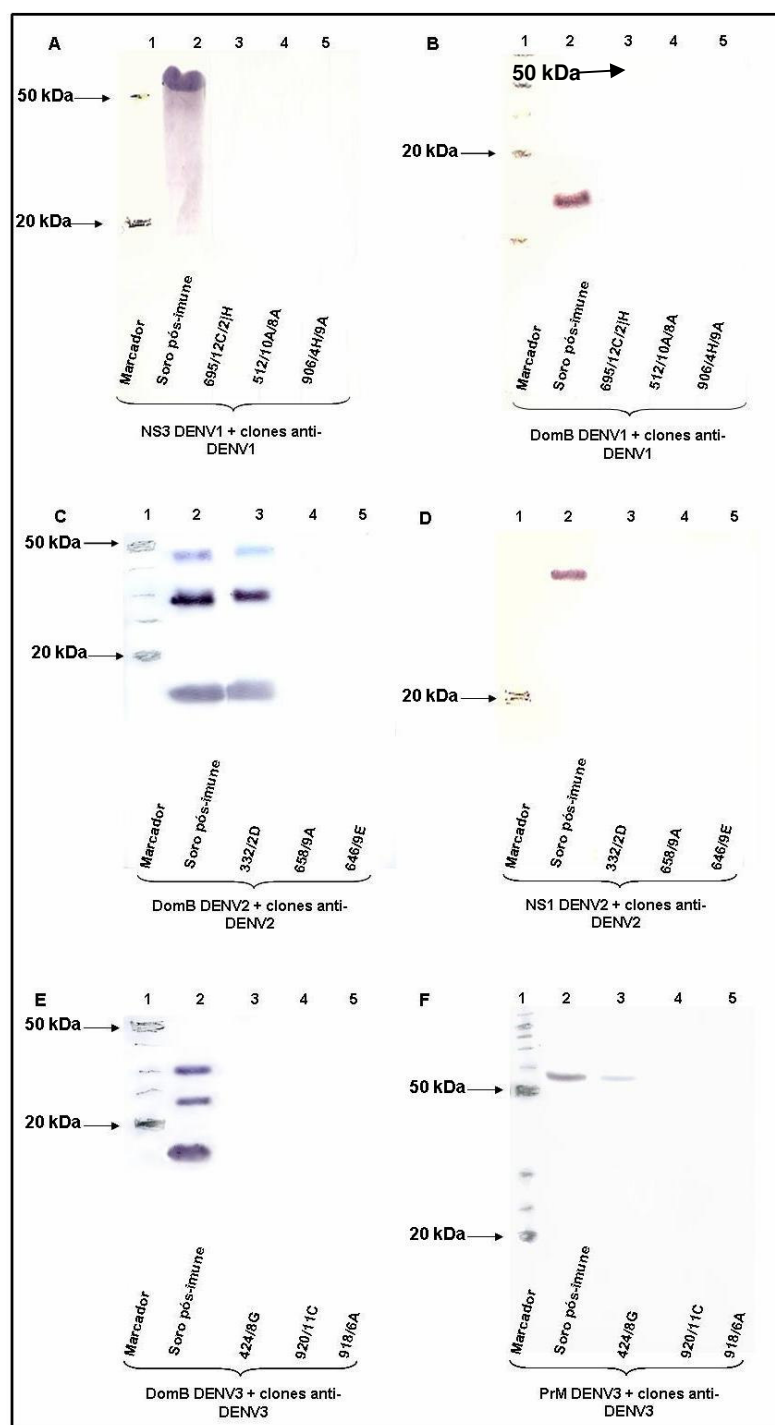


Figura 6.12 Western blot dos mAbs produzidos contra proteínas estruturais e não estruturais de DENV-1, -2 e -3. As membranas foram reagidas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. A) proteína NS3 de DENV-1 incubada com os mAbs 695/12C/2H, 512/10A/8A e 906/4H/9A (~ 58 kDa), em gel SDS/PAGE 13%; B) E domínio B de DENV-1 incubada com os mAbs 695/12C/2H, 512/10A/8A e 906/4H/9A (~18 kDa), em gel SDS/PAGE de 15%; C) E domínio B de DENV-2 incubada com os mAbs 658/9A, 646/9G, 332/2D (~18 kDa), em gel de SDS/PAGE 15%; D) proteína NS1 de DENV-2 incubada com os mAbs 658/9A, 646/9G, 332/2D (~45 kDa), em gel SDS/PAGE de 13%; E) E domínio B de DENV-3 incubada com os mAbs 424/8G, 918/6A, 920/11C (~18kDa), em gel SDS/PAGE de 15%; F) proteína prM/E de DENV-3 incubada com os mAbs 424/8G, 918/6A, 920/11C (~ 65 kDa), em gel SDS/PAGE de 13%.

7. Discussão dos resultados

7.1 Considerações sobre a técnica de hibridomas desenvolvida por Kohler & Milstein, (1975)

No início do século passado, Paul Elrich sugeriu que “balas mágicas” poderiam ser criadas contra uma doença específica. Estas “balas mágicas” só vieram a ser desenvolvidas na prática quase um século depois, em 1975, quando Kohler & Milstein descreveram uma técnica de produção de anticorpos monoclonais (mAbs) por uma linhagem de células denominada hibridoma, formadas pela fusão de linfócitos B (secretores de anticorpos) e células mielômicas (Adams & Weiner, 2005; Kohler & Milstein, 1975; Oi *et al.*, 1984).

A produção de anticorpos monoclonais tem importante impacto no processo de desenvolvimento de insumos para o imunodiagnóstico, mapeamento de tumores, sistema de direcionamento (*delivery*) de drogas de forma específica, tratamento de câncer entre outras aplicações (Carter, 2006). O crescente uso de mAbs tem levantado a importância de estudos que consideram a produção dessas biomoléculas de forma rápida e em larga escala. É bem descrito na literatura que as condições de cultivo e os compostos do meio geram efeitos consideráveis no crescimento celular e na produção dos mAbs (Lambert & Merten, 1997; Barnabé & Butler, 2000). A glicose é a principal fonte de carbono para a célula e a glutamina fonte de nitrogênio (McKeehan, 1982), e desta forma, esses nutrientes aparecem como fatores limitantes para o crescimento celular (Dalili *et al.*, 1990). A proporção de cada nutriente, consumido por diferentes vias, depende do estado metabólico da célula, que por sua vez é dependente dos nutrientes contidos no ambiente celular (Cruz *et al.*, 1999). A produção de produtos tóxicos oriundos do metabolismo celular tem sido relatada como um fator inibitório, ou tóxico para as células, sendo o lactato e a amônia os mais importantes (Cruz *et al.*, 2000; Chen & Harcum, 2006). A produção de lactato ocorre, principalmente, pela oxidação incompleta da glicose durante a via glicolítica (Miller *et al.* 1988) e a excreção da amônia é gerada pelas células através do metabolismo de aminoácidos, principalmente a glutamina (Schneider *et al.* 1996).

Todas essas variáveis podem ser quantificadas e possibilitam comparar condições de cultivo entre diferentes linhagens de células, gerando dados relevantes

para a padronização das condições de cultivo celular e, conseqüentemente de secreção de anticorpos (Goudar et al., 2005). Trabalhos considerando sistemas de culturas de hibridomas com o objetivo de acompanhar a cinética de crescimento e produção de mAbs já foram realizados previamente. Acosta et al., (2007) caracterizaram o metabolismo de glicose e glutamina de hibridomas murinos produtores de mAbs anti-HIV. Os autores avaliaram a cinética, estequiometria e o potencial de regulação das vias de consumo de glicose e de glutamina e a correlação de crescimento celular e produção dos mAbs. Equações foram usadas para estimar o número de células totais e de células viáveis, concentrações de nutrientes e metabolitos/produtos gerados. Os autores observaram que as equações, conhecidas como equações assimétricas logísticas (ALEs), foram capazes de descrever de forma satisfatória a cultura de hibridomas, inclusive durante a fase de decaimento celular. Além disso, observaram que a produção de mAbs não foi associado com a taxa de crescimento celular, sendo independente também dos níveis de glicose e glutamina. Segundo os autores a produção de mAbs difere significativamente entre diferentes linhagens de células e hibridomas, e a produção dos mAbs podem diminuir ou aumentar com a taxa de crescimento celular, ou ainda ser independente deste fator (Acosta et al., 2007).

No presente trabalho foram obtidos vários hibridomas produtores de anticorpos dirigidos contra cepas de vírus dengue do sorotipo 1, 2, 3 e contra a nucleoproteína recombinante do hantavírus Araucária.

Vários são os fatores que podem estar associados com o rendimento do processo de produção de hibridomas. O tempo preciso de retirada do baço, após a última imunização, tem sido associado como fator determinante no resultado da fusão e produção de monoclonais gerados por essa técnica (Sthal et al., 1983; Cianfriglia et al., 1987). Outros fatores que podem alterar o sucesso da fusão incluem: protocolo de mistura de células, temperatura, agente fusogênico, proporção de células mielômicas/linfócitos, tampões e meios, tempo de fusão, protocolo de retirada das células para a fusão. Os protocolos de fusão são bastante empíricos e têm sido observadas grandes variações de um laboratório para outro ou até mesmo de experimento para experimento (Igarashi & Bando, 1990).

Nós optamos por realizar o processo de fusão pela adição de polietilenoglicol (PEG) à suspensão de linfócitos e células mielômicas. Este método tem um

rendimento de frequência de fusão em torno de 3×10^5 – 6×10^6 células hibridizadas (Lane et al, 1984; Lane et al. 1986). A frequência de fusão é definida pelo número de hibridomas gerados dividido pelo número de linfócitos utilizados na fusão (aproximadamente 1×10^8 células totais de um único baço).

Um método alternativo para o uso do PEG como agente fusogênico é a eletrofusão. Sob condições ótimas, tem sido possível aumentar a frequência de fusão cerca de 80x quando comparado ao método tradicional de utilização do PEG (Schmitt et al. 1989). Hui e Stenger (1993) compilaram os trabalhos que utilizam PEG e eletrofusão para produção de hibridomas. Foi possível concluir que o procedimento de eletrofusão aumenta as taxas de fusão, seja pela medida de hibridomas resistentes ao HAT ou pelo número de clones produzindo os anticorpos desejados. Outro trabalho indicou um aumento de 10x nas taxas de fusão utilizando a eletrofusão quando comparado ao método de PEG em 36 experimentos (Karsten et al. 1993).

Outra técnica utilizada para aumentar as taxas de sucesso da fusão emprega o uso da enzima neuramidase. A neuramidase é utilizada para remover o ácido siálico da membrana celular (Igarashi & Bando, 1990). É provável que o ácido siálico seja capaz de prevenir o contato intercelular das membranas extracelulares dificultando a fusão por PEG. Em um estudo foi observado que o tratamento com neuramidase foi capaz de gerar, aproximadamente, duas vezes mais clones resistentes ao HAT e oito vezes mais clones específicos para o antígeno, quando comparado com células não tratadas (Siraganian et al., 1983). Embora este protocolo não tenha sido utilizado, devido ao rendimento satisfatório da maior parte das fusões realizadas nos experimentos, é importante apontá-lo como um método auxiliar para melhorar a taxa de fusão em protocolos onde se observa, com frequência, rendimento baixo.

Os métodos de fusão descritos acima não discriminam a etapa do ciclo celular ou ainda as células que serão fusionadas. A fusão pode ocorrer na mitose ou intérfase e dependendo da fase pode se estabelecer um fenômeno conhecido como condensação prematura dos cromossomos (Westewoudt, 1985), capaz de interromper a divisão celular. A nova célula formada – o hibridoma – contém todos os cromossomos das células parentais. Este número deve ser reduzido para um número normal de cromossomos para assegurar o crescimento da célula. Isso

requer a perda de cromossomos complementares, que pode incluir cromossomos contendo os genes de expressão para anticorpos. Cerca de 50% dos hibridomas gerados que inicialmente expressam anticorpos contra um antígeno desejado perdem a habilidade de expressão devido à perda cromossomal (Clarck & Milstein 1981). Este dado está de acordo com os resultados observados no presente estudo onde vários clones submetidos a dois ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento perderam a capacidade de expressão de mAbs. Além disso, o gene que confere resistência ao meio HAT dos linfócitos pode ser perdido, tornando os hibridomas inaptos a sobreviverem no meio seletivo (Taggart & Samloff 1983).

7.2 Anticorpos monoclonais anti-dengue

Os primeiros anticorpos monoclonais desenvolvidos para a dengue datam do ano de 1980, e foram desenvolvidos para o sorotipo - 3 do vírus e apresentavam atividade de inibição de hemaglutinação específica para o sorotipo-3 do vírus, não reagindo contra os sorotipos-1 e -2 e -4 (Dittmar et al., 1980). No ano seguinte, Henchal et al., (1982) foram capazes de definir o sorotipo responsável por uma infecção pelo DENV utilizando-se mAbs anti-dengue sorotipo-específicos. Kuno, Gubler & Santiago, (1985) desenvolveram o primeiro teste imunoenzimático de captura de antígenos (ELISA) para identificação da infecção pelo DENV utilizando anticorpos monoclonais sorotipo-específicos. Vários outros trabalhos utilizaram mAbs dirigidos contra diferentes proteínas do DENV para o desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos para a detecção da infecção pelo DENV (Monath et al., 1986; Burke et al., 1987; Young et al., 2000; Xu et al., 2006)

No presente trabalho a fusão para produção de mAbs contra cepas de DENV-1, -2 e -3 geraram grande quantidade de hibridomas secretores de mAbs (n=147). As fusões de dengue BR-01/MR, BR DEN2 EN-02 e BR DEN3 290-02 geraram ao todo 2.604 poços, dos quais foram triados por IFI 1.100 poços (42 % do número total). Foram obtidos 65 clones de DEN1 BR-01/MR, 4 clones positivos de BR DEN2 EN-02 e 60 clones positivos para BR DEN3 290-02. Da fusão anti-dengue grupo-específico, dos dois animais imunizados com as três cepas de dengue, foram gerados 228 poços dos quais apenas 20 poços apresentaram crescimento celular favorável, sendo estes triados por IFI. Foram obtidos 14 poços positivos sendo que um clone cessou a secreção e anticorpo dentro de um período de 10 dias. Os 13

hibridomas restantes foram dirigidos contra antígenos da célula C6/36 (substrato celular para o crescimento viral) e não contra o vírus.

A taxa de rendimento dos hibridomas positivos anti-dengue 2 e dos hibridomas dengue grupo-específicos foi baixa e nula, respectivamente. Dos 377 hibridomas produzidos a partir da imunização com vírus BR DEN2 EN-02 apenas quatro foram positivos, dos quais três permaneceram estáveis após dois ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento. Não se conhece o motivo do baixo rendimento de hibridomas positivos obtidos a partir de imunização com a cepa de DENV-2. O soro dos animais após a quinta imunização com a cepa de DENV-2 mostrou soro-conversão para o antígeno em questão, conforme avaliado por IFI (resultados não mostrados). Deste modo, o protocolo de imunização não parece ter sido o problema para o baixo rendimento da fusão com a cepa de DENV-2.

Apesar de não termos observado nenhum hibridoma estável na fusão para a geração de mAbs grupo-específicos, os mAbs anti-DENV-1 e DENV-3 demonstraram reatividade cruzada com os demais sorotipos de DENV. Esse achado pode estar implicado na conservação de epítomos virais entre as cepas de DENV-1, -2 e -3 utilizadas neste trabalho. Antúñez et al., (2001) demonstraram que mAbs gerados a partir da imunização com a cepa H-241 do sorotipo 4 apresentavam padrões de reatividade cruzada com cepas de DENV-1, -2 e -3 muito variados e dependentes dos tipos de ensaios utilizados (IFI, imunoperoxidase e inibição de hemaglutinação). Contrariamente, os três hibridomas estáveis obtidos a partir de imunização com BR DEN2 EN-02 mostraram-se sorotipo-específico quando avaliados por IFI (Figura 6.10), não reconhecendo as cepas de DENV-1 e -3.

Todos os nove hibridomas anti-dengue gerados apresentaram no ensaio de IFI um padrão semelhante de reação, caracterizado por forte marcação peri-nuclear (Figuras 6.9, 6.10, 6.11). O mesmo resultado foi observado com os controles positivos (Figura 6.8). Cardiff et al. (1973) realizaram um estudo sobre a distribuição de antígenos do vírus DENV-2 em células renais de macaco. Os autores observaram intensa marcação perinuclear. Este padrão de fluorescência foi associado com antígenos não pertencentes ao vírion, isto é, a proteínas não-estruturais. Além disso, proteínas estruturais e não-estruturais sintetizadas previamente a fase da liberação viral podem concentrar-se na região perinuclear, evidenciando intensa fluorescência nesta região da célula (Cardiff et al. 1973). Este

resultado não é inesperado uma vez que a tradução das proteínas virais ocorre em associação com as membranas do retículo endoplasmático rugoso (RER) (Lindenbach & Rice, 2001), as quais se localizam ao redor do núcleo celular.

Uma vez que o vírus da dengue apresenta 10 proteínas na sua composição (3 estruturais e 7 não-estruturais) é necessário determinar os alvos-protéico que os mAbs reconhecem. Para tanto se utilizaram às proteínas: Domínio B da proteína de envelope (E dom B) do DENV-1, -2 e -3, NS1 de DENV-2 e NS3 de DENV-1 e a quimera prM/E de DENV-3, (produzidas no laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas) em ensaios de *western blot*. Estes ensaios permitiram identificar o alvo protéico de dois mAbs: o 332/2D (anti-DENV-2) e o 424/8G (anti-DENV-3), capazes de reconhecer as proteínas de envelope viral (mais especificamente o domínio B) e a proteína quimérica (prM/E), respectivamente. Os demais sete clones não mostraram reatividade para as proteínas testadas, o que pode ser explicado pela não-conservação de epítomos conformacionais nas proteínas, pela utilização de gel SDS-PAGE desnaturante, ou pelo fato de que os hibridomas reconhecem outras proteínas não testadas neste ensaio. Para a identificação dos alvos-protéicos dos demais serão necessários estudos adicionais utilizando a técnica de imunoprecipitação

A geração de anticorpos para a glicoproteína de envelope do DENV, tem sido associada com processos de proteção ou agravamento do quadro da doença, especialmente após a infecção primária. O principal componente antigênico do DENV é a proteína de envelope, que é capaz de elicitar a produção de grande quantidade de anticorpos. Esta proteína contém epítomos que reagem de forma cruzada com outros flavívirus, e ainda epítomos específicos do vírus em questão (Lindenbach et al., 2001; Crill & Chang, 2004).

Neste estudo, o mAb 332/2D gerado a partir de animais imunizados com a cepa BR DEN2 – 02, foi específico para este sorotipo (Figura 6.10). Nos resultados de ensaios de *western blotting* observou-se especificidade deste mAb para o domínio antigênico B (ou III) da proteína E (Figura 6.12 C). No estudo de Roehrig et al., (1998) epítomos localizados no domínio B da proteína E elicitaram mAbs capazes de neutralizar fortemente a infectividade viral e de bloquear reações de hemaglutinação. Petty et al., (2007) observaram em um estudo *in vitro* que epítomos distintos localizados na região de domínio III de uma cepa de DENV-2 foi capaz de

elicitar a formação de anticorpos tipo-específicos e com reatividade cruzada. Segundo os autores, todos os anticorpos testados apresentaram potenciais de neutralização diferenciados (Petty et al., 2007). Além disso, Falconar (1999) demonstrou com a utilização de modelo murino que mAbs anti-E e anti-M (proteína de membrana) são capazes de proteger de maneira cruzada contra os 4 sorotipos do vírus da dengue. Adicionalmente, foram identificados os epítomos de ligação destes mAbs como sendo o domínio III imunodominante e a região de dobradiça entre o domínio I e II na proteína de envelope, e região da proteína de membrana conhecida como *membrane-spanning domain*.

O anticorpo monoclonal 424/8G, produzido por imunização de animais com a cepa BR DENV3-290, reagiu no ensaio de IFI com as demais cepas de DENV utilizadas no nosso estudo (Figura 6.11). Adicionalmente, em ensaio de *western blot* este anticorpo foi capaz de reconhecer de forma específica a proteína quimérica prM/E de BR DENV3-290 (Figura 6.12 F). Kaufman et al., (1989) demonstraram que a administração passiva de anticorpos monoclonais murinos capazes de reconhecer a proteína prM do DENV-3 e -4 foi capaz de proteger camundongos contra desafio letal com sorotipos homólogos ou heterólogos do vírus da dengue. Segundo os mesmos autores, o mecanismo de proteção não parece ser mediado exclusivamente por neutralização viral, mas também por fixação de complemento.

A taxa de rendimento dos hibridomas grupo-específico para dengue foi nula, tendo sido obtidos poucos clones com crescimento celular desejável, sendo que nenhum apresentou secreção de anticorpos de interesse. É desconhecido o fato que pode ter resultado no baixo rendimento de geração de hibridomas a partir da imunização concomitante de animais com as três cepas. O soro dos animais após a sexta imunização mostrou soro-conversão para os antígenos em questão, conforme avaliado por IFI (resultados não mostrados). Deste modo, o protocolo de imunização não parece ter sido o problema para o insucesso nesta fusão.

Outra aplicação importante dos monoclonais contra o vírus da dengue é o imunodiagnóstico. Devido a carência de imunoensaios produzidos com tecnologia nacional o desenvolvimento de mAbs contra isolados brasileiros do vírus da dengue aparecem como ferramentas indispensáveis neste campo. Recentemente, Xu et al., (2006) desenvolveram um teste de ELISA de captura de antígeno utilizando mAbs contra a proteína NS1 do DENV-1. O ensaio permitiu a detecção precoce da

proteína NS1 no soro de pacientes com suspeita de dengue, e demonstrou alta sensibilidade (82% comparado ao RT-PCR) e especificidade (98.9%), não tendo sido observado reação cruzada com soro de pacientes infectados com DENV-2, -3 e -4, bem como, outros flavivírus, como encefalite japonesa e febre amarela.

7.3 Anticorpos monoclonais contra a nucleoproteína recombinante de hantavírus

Em 1983 foram gerados os primeiros monoclonais específicos para hantavirus através da tecnologia de hibridomas. Estes anticorpos foram capazes de reconhecer uma proteína com peso molecular de 50 kDa, até então desconhecida Franco et al. (1983). Desde então uso de policlonais e monoclonais tornou-se uma ferramenta valiosa para confirmar a existência de uma relação antigênica da HFRS com isolados virais obtidos de roedores (Gavrilovskaya et al. 1983). Nos anos seguintes, a utilização de monoclonais para o diagnóstico para hantavirose ganhou força quando foi descoberto que a nucleoproteína dos hantavirus contém sítios antigênicos conservados que poderiam ser utilizados para o diagnóstico de distintas linhagens de hantavirus (Ruo et al., 1991). O campo de utilização de monoclonais foi ampliado para o diagnóstico e diferenciação de isolados obtidos na Rússia e de outros países (Dzagurova et al. 1996). Consequentemente, kits para o diagnóstico de hantavirose, com formatos distintos, foram montados.

Como exemplo é possível citar o trabalho de Ivanov et al. (1996) onde os autores utilizaram anticorpos monoclonais conjugados com biotina para confecção de um ensaio enzimático para detecção específica do vírus Puumala. Após a descoberta de que a nucleoproteína do hantavirus era o antígeno imunodominante em HFRS por induzir uma resposta imune precoce e de longa duração a antigenicidade desta proteína foi testada em ensaios imunoenzimáticos e imunoblots. Estudos revelaram que a resposta imune humana era primariamente direcionada contra epítomos localizados na região amino terminal desta proteína (Park & Kim, 1997). Recentemente, um teste tipo ELISA utilizando monoclonais direcionados contra a nucleoproteína de hantavírus foi desenvolvido para detectar a nucleoproteína circulante no soro de pacientes com HFRS. Os resultados foram comparados com um teste ELISA para a detecção de IgM. Como resultado observou-se que o ELISA empregando monoclonais foi mais específico para o

diagnóstico de HRFS do que o método convencional para detecção de IgM, especialmente em pacientes no estágio inicial de infecção (Wang et al., 1993).

Entre os monoclonais anti-hantavirus gerados, nove foram estabilizados por congelamento e descongelamento, e desta forma, selecionados para os ensaios de caracterização. Estes anticorpos foram capazes de reconhecer rNH expressa e purificada em sistema procariótico, com peso molecular de ~50 kDa (Figura 6.3). No entanto, foi observado um padrão multi-bandas desta proteína. Esse fato pode estar atribuído ao padrão de processamento da rNH em sistema procariótico. Observando a figura 6.3 é possível notar que a fragmentação acontece em pontos específicos, pois o mesmo padrão de bandas é observado com a utilização de anticorpos policlonais e monoclonais. Adicionalmente, os ensaios de imunofluorescência indireta, utilizando células Vero E6 infectadas com a cepa de hantavírus Maciel demonstraram a especificidade dos mAbs gerados. Tanto, os controles positivos (soro humano e murino pós-imune) e os mAbs anti-rNH exibiram fluorescência localizada na região peri-nuclear (Figura 6.4), o que corrobora com resultados de Ravkov & Compans, (2001). Estes autores sugerem que o padrão peri-nuclear de localização da nucleoproteína está relacionado ao mecanismo de montagem das proteínas virais dos hantavirus (Ravkov & Compans, 2001). A nucleoproteína é expressa como uma proteína citoplasmática, e após a sua interação com segmentos do RNA viral é direcionada para as membranas no complexo de Golgi, que por sua vez estão localizadas na região peri-nuclear (Ravkov & Compans, 2001; Kukkonen et al., 2004).

Ainda dentro do processo de caracterização dos mAbs anti rNH foram realizadas análises de imunohistoquímica de tecido pulmonar obtido de um caso fatal de SCPH. Mais uma vez os resultados mostraram a especificidade e a aplicabilidade dos mAbs anti rNH na detecção da infecção por hantavírus em tecidos humanos (Figura 6.5). As análises do tecido revelaram uma forte e específica marcação principalmente de macrófagos alveolares e de células epiteliais, conforme descrito por Zaki et al., (1995). Segundo Nolte et al., (1995) e Zaki et al., (1995) os pulmões são os órgãos mais lesados na SCPH, onde se observa a presença de edema pulmonar, com discreta membrana hialina, infiltrado linfocitário intersticial, macrófagos ativados e extensa presença de antígenos virais. Porém, pesquisas com imunohistoquímica demonstram a presença de antígenos virais em diversos órgãos dos pacientes com SCPH, incluindo pulmões, rins, coração, baço, pâncreas,

linfonodos, musculatura esquelética, intestino, glândula supra-renal, tecido adiposo, bexiga e cérebro. Os antígenos são granulares e encontrados predominantemente dentro das células endoteliais de capilares e pequenos vasos (Zaki et al., 1995).

Foi observado durante a cinética de crescimento dos hibridomas anti-rNH de ARAUV que todos os clones apresentaram, pelo menos em algum ponto temporal, crescimento distinto do observado pelo grupo controle, o mieloma Ag8XP3653. Estes dados demonstram que o processo de fusão foi capaz de modificar as características de crescimento do mieloma original Ag8XP3653. Interessantemente, a análise dos resultados mostrados nas Figuras 6.6 e 6.7 permite avaliar que os hibridomas que apresentaram as maiores taxas de crescimento celular (651/6G e 305/8C), não necessariamente foram os que apresentaram maiores títulos de anticorpo no sobrenadante de cultura (572/7A e 581/8G). Estes dados podem ser relevantes para etapas de escolha de hibridomas para utilização em ensaios imunológicos, bem como, para produção em larga escala.

A utilização de anticorpos monoclonais contra hantavírus não se resume somente a produção de kits para o diagnóstico desse agravo, mas também como potencial tratamento imunoterápico da doença. Xu et al., (2002) produziram 18 mAbs com diferentes especificidades contra o hantavirus Hantaan. Destes mAbs, os específicos contra epítomos da glicoproteína G2 foram capazes de neutralizar o vírus *in vitro* e em *vivo* mostrando-se muito úteis tanto na pré- como para pós-profilaxia da infecção, bem como na imunoterapia nas infecções pelo hantavírus Hantaan em modelo murino. O efeito protetor de anticorpos administrados de forma passiva também já foi demonstrado em ratos recém-nascidos infectados com a cepa de hantavirus SR-11. Os ratos que receberam doses de soro anti-SR11 4 horas antes do desafio viral foram protegidos e não foram a óbito quando inoculados pelas vias intramuscular e subcutânea (mas não pela via cerebral). Foi também demonstrado em modelo de primatas não-humanos que a transferência passiva de anticorpos de soro de macacos vacinados com vacina de DNA baseado em segmento M de ANDV foi capaz de proteger hamsters da infecção letal pelos ANDV quando administrado até o 5.º dia pós-exposição (Custer, Thompson & Schmaljohn, 2003). Este resultado indica que o desenvolvimento de anticorpos policlonais em primatas, incluindo humanos, imunizados com esta vacina de DNA, poderia ser usado para tratar pessoas expostas à infecção por hantavírus associados ao SCPH. Esses relatos têm sido reforçados por trabalhos realizados com humanos e roedores que demonstram

que anticorpos maternos podem proteger contra infecções por hantavírus, sugerindo que a resposta imune humoral é um importante fator na determinação do curso da infecção (Pai et al., 1999 *in* Rizvanov et al., 2003; Yu et al., 2006). Relatos clínicos demonstram que pacientes com altos títulos de anticorpos neutralizantes apresentam uma evolução clínica mais favorável, sugerindo que a imunoterapia pode ser uma opção de tratamento das pessoas com expostas a SCPH (Bharadwaj et al., 2000). Resumidamente, considerando que a resposta imune humoral desempenha um papel importante tanto no curso da infecção como na evolução da doença, a produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra hantavírus pode ser de extrema valia para o desenho de estratégias de imunoterapia para o tratamento desse agravo.

8. Considerações finais

Um ponto importante na utilização da técnica de produção de monoclonais pela técnica de fusão celular é a escolha do imunógeno. É descrito na literatura que para a produção de mAbs pela técnica de hibridoma é possível utilizar peptídeos, proteínas purificadas, parcialmente purificadas ou ainda amostras de tecidos não purificadas, com características solúveis ou insolúveis (Stahl et al., 1983; Cianfriglia et al., 1987). No entanto, no presente trabalho a utilização de antígenos parcialmente purificados resultou em dificuldades no momento da triagem dos anticorpos de interesse.

Ao longo dos experimentos diversos hibridomas produzidos a partir da imunização com vírus dengue produziram anticorpos contra as células utilizadas no processo de triagem (C6/36). Os estoques virais utilizados para imunização dos animais foram obtidos em cultivo de células de mosquito (C6/36), ou seja, as mesmas células utilizadas em um segundo momento para o processo de triagem dos mAbs de interesse. Para contornar esse problema pode-se utilizar uma linhagem celular para expansão do estoque viral utilizado como imunógeno, e outra linhagem celular distinta da primeira para a etapa de triagem. Porém, segundo Simantini & Banerjee, (1995) podem ocorrer diferenças no padrão de reatividade dos mAbs em diferentes linhagens de células, o que pode acarretar aparecimento de falsos negativos durante o processo de triagem dos hibridomas. Os mesmos autores atribuem este fato ao processamento pós-transducional diferenciado de proteínas virais em distintas linhagens celulares.

Outro estudo utilizando a tecnologia de hibridomas, no qual foram produzidos anticorpos monoclonais dirigidos contra a proteína NS3 de DENV-1, utilizou como imunógeno preparação de cérebros de camundongos infectados com vírus. Porém, para a etapa de triagem por ELISA, os antígenos virais foram preparados em células de mosquito C6/36 para evitar a seleção de hibridomas secretores de anticorpos para proteínas do cérebro (Tan et al., 1990). Diante o exposto, embora amplamente disseminado na literatura que não é necessário a utilização de antígenos purificados para a produção de mAbs pela técnica de hibridomas, esta se torna mais simples, principalmente na etapa de triagem dos hibridomas, quando se utiliza antígenos purificados.

A segregação e a reorganização dos cromossomos produzem nas células híbridas uma considerável variabilidade nas propriedades de crescimento, que só se estabiliza cerca de 20 a 25 dias após a fusão (Nowinski et al., 1983; Nelson, 2000). Para a etapa de estabilização, o congelamento e descongelamento de células têm sido utilizados com sucesso para determinar quais hibridomas são instáveis, já que esse processo resulta na inibição da produção de anticorpos em linhagens instáveis (Pravtcheva & Ruddle, 1983). Porém, não existem trabalhos na literatura apontando o número de ciclos de congelamento e descongelamento necessários para assegurar a estabilidade dos hibridomas. Kobayashi et al. (1984) utilizaram a técnica de cariótipo para determinar a quantidade de cromossomos de hibridomas produtores de monoclonais para o vírus da encefalite japonesa. É possível que essa técnica possa ser utilizada como método auxiliar para o acompanhamento da estabilidade dos hibridomas.

Finalmente, a utilização de anticorpos monoclonais para o desenvolvimento de testes diagnósticos para dengue e hantavirose é uma alternativa atraente, contornando alguns problemas presentes nos testes utilizados atualmente, tais como: alto custo, reatividade cruzada, necessidade de um laboratório bem equipado para a realização dos mesmos, equipe bem treinada e necessidade de tempo para o isolamento do vírus em cultivo. Como consequência direta, a produção de mAbs anti-hantavirus e anti-dengue podem auxiliar a ampliação de estudos de soroprevalência de dengue em áreas endêmicas, além de permitir maior monitoramento de reservatórios do hantavirus no Brasil. Além disso, o mercado dessas importantes biomoléculas vem crescendo de forma gradativa. Por esse motivo, estudos que buscam a produção dessas moléculas de alto valor agregado são de fundamental importância em nosso país, reduzindo a dependência de processos de importação para obtenção destes insumos.

9. Conclusões

- Foram produzidos anticorpos monoclonais anti-DENV-1, -2 e -3. Entre os mAbs produzidos três clones anti-DENV-1, -2 e -3 foram estabilizados, isotipados e caracterizados.
- Os mAbs anti-DENV-1 (512 10A/8A, 906 4H/9A, 695 12C/2H) e anti-DENV-3 (424/8G, 918/6A, 920/11C) apresentaram reação cruzada com os três sorotipos de DENV utilizados no presente trabalho.
- Ao contrário, os mAbs anti-DENV-2 (646/9G, 332/2D e 658/9A) mostraram-se específicos para o sorotipo 2 do DENV, não apresentando reação cruzada com os sorotipos 1 e 3.
- O alvo protéico do mAb anti-DENV-2 332/2D foi identificado como sendo um domínio da proteína quimérica prM/E do DENV-3.
- O alvo protéico do mAb anti-DENV-3 424/8G foi identificado como sendo a proteína de envelope do DENV-3.
- Foram produzidos anticorpos monoclonais contra a nucleoproteína recombinante do hantavírus Araucária. Nove destes mAbs foram estabilizados e isotipados. Todos os nove mAbs mostraram-se específicos para a rNP através de ensaios de *western blot* e IFI.
- Foi possível demonstrar a aplicabilidade dos mAb anti rNH 313/11E em ensaios de imunohistoquímica com tecido pulmonar de um caso fatal de hantavirose.
- Não foi possível observar relação positiva entre o crescimento celular dos mAbs anti-rNH e os títulos de anticorpo presente nos sobrenadantes destas culturas.

10. Perspectivas

- Concentrar e purificar os mAbs anti-rNH produzidos para sua utilização em testes diagnóstico e pesquisa básica.
- Conjugar os mAbs anti-rNH com a enzima peroxidase visando sua utilização em testes imunoenzimáticos de captura.
- Testar a reatividade cruzada dos mAbs anti-DENV produzidos contra diferentes cepas de DENV-1, -2 e -3.
- Testar a aplicação dos mAbs anti-DENV produzidos, comparativamente ao mAb comercial 4G2, nas técnicas de citometria de fluxo e imunohistoquímica.
- Realizar ensaios de imunoprecipitação para identificar os alvos-protéicos dos mAbs 512 10A/8A, 906 4H/9A, 695 12C/2H, 646/9G, 658/9A, 918/6A, 920/11C).
- Testar a atividade neutralizante dos mAbs anti-DENV gerados *in vitro*.
- Conjugar os mAbs anti-DENV com corantes fluorescentes (FITC, PE ou Alexa 488) para utilização em ensaios de imunofluorescência direta e citometria de fluxo.
- Conjugar os mAbs anti-DENV específico (que reconhecem os três sorotipos do DENV) com a enzima peroxidase visando sua utilização em testes imunoenzimáticos de captura.
- Caracterizar o restante dos mAbs anti-DENV-1 (n=47) e anti-DENV-3 (n=45) (desenvolvidos neste projeto, porém, não caracterizados) visando encontrar clones que reconhecem especificamente o sorotipo 1 e 3, o que poderia ser útil no desenvolvimento de um teste de ELISA sorotipo-específico.

11. Referências Bibliográficas

ABBAS, A.K; Lichtman, A.H; Pilai, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6° ed. Elsevier editora Ltda, Rio de Janeiro, RJ, 2008.

ACOSTA, M.L; Sánchez, A; García, F et al. Analysis of kinetic, stoichiometry and regulation of glucose and glutamine metabolism in hybridoma batch cultures using logistic equations. *Cytotechnology*. v. 54, p. 189–200, 2007.

ADAMSdams, G.P & Weiner, L .*Monoclonal antibody therapy of cancer*. v. 23, n 9, p. 1147-1157, 2005.

AHN, C. et al. Detection of Hantaan and Seoul viruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and restriction fragment lenght polymorphism (RFLP) in renal syndrome patients with hemorrhagic fever. *Clin. Neph.*, Deisenhofen, v.53, n.2, p.79-89, 2000.

ANTÚNEZ, P.M.A; Rodriguez, R; Alvarez, M et al. Development of a monoclonal antibody specific to a recombinant envelope protein from dengue virus type 4 expressed in *Pichia pastoris*. *Hybridoma*. v. 20(1), p. 35-41, 2001.

ARIKAWA, J; Schmaljohn, A.L; Dalrymple, J.M et al. Characterization of Hantaan virus envelope glycoprotein antigenic determinants defined by monoclonal antibodies. *Gen Virol*. v.70, n.3, p.615-624, 1989.

ARMIEN, B; Pascale, J.M; Bayard, V et al. High seroprevalence of hantavirus infection on the Azuero peninsula of Panama. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. v. 70, n.6, p. 682-687, 2004.

ARTHUR, R.R; Lofts, S; Gómez, J. E; Glass, J.W et al. Grouping of Hantaviruses by small (S) genome segment polymerase chain reaction and amplification of viral RNA from wild-caught rats. *Am.J.Trop.Med. Hyg*. v. 47, p.210-224, 1992.

BARNABE, N & Butlet, M. The effect of glucose and glutamine on the intracellular nucleotide pool and oxygen uptake rate of a murine hybridoma. *Cytotechnology*. v. 34, p. 47–57, 2000.

BESSOF, K; Delorey, M; Sun, W et al. Comparison of Two Commercially Available Dengue Virus (DENV) NS1 Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Using a Single Clinical Sample for Diagnosis of Acute DENV Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 15, n. 10, p. 1513-1518, 2008.

BHARADWAJ, M; Nofchissey, R; Goade, D et al. Humoral immune responses in the hantavirus cardiopulmonary syndrome. *J Infect Dis*. v. 182, n.1, p. 43-48, 2000.

BILLECOCQ, A.D; Coudrier, F; Boue, B et al. Expression of the nucleoprotein of the Puumala vírus from the recombinant Semliki Forest vírus replicon: characterization and use as a potential diagnostic tool. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. v.10, p. 658-663, 2003.

BORBA, L. Desenvolvimento de novos insumos para o diagnóstico sorológico da dengue: antígenos virais nativos e recombinantes. Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil, 2004.

BROWN, T.M; Mitchell, C.J; Nasci, R.S et al. Detection of eastern equine encephalites virus in infected mosquitoes using a monoclonal antibody-based antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 65, n. 3, p. 208-213, 2001.

BURKE, S.D & Monath, T.P. Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM & Fields BN: *Fields Virology*. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. New York. p. 1042-1126, 2001.

CARTER, P.J. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev.* v. 6, p.343–357, 2006.

CHEN, P & Harcum, S.W. Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expresion in CHO cells. *Metabol Eng.* v. 8, p. 123–132, 2006.

CHEN, Y. C; Huang, H.N; Lin, C.T et al. Generation and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Dengue Virus Type 1 for Epitope Mapping and Serological Detection by Epitope-Based Peptide Antigens. *Clinical and Vaccine Immunology.* v. 14(4), p. 404-411, 2007

CHEN, Y.T; Maguire, T & Marks, M.R . Demonstration of binding of dengue virus envelope protein target cells. *J. Virol.* v. 70, p. 8765-8772, 1996.

CHEN, Y.T; Maguire, T; Hileman, R. E et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Medicine.* v. 3, p. 866-871, 1997.

CIANFRIGLIA, M; Nuti, M; Turchi, V et al. High frequency production of hybridomas secreting antibodies to cell antigens. v. 6, n. 6, p, 673-677, 1987.

CLARK, M.R & Milstein, C. Expression of spleen cell immunoglobulin phenotype in hybrids with myeloma cell lines. *Somatic Cell Genet.* v. 7, n.6, p. 657-666, 1981.

COSTA, S.M; Freire, M.S; Alves, A.M.B. DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. *Vaccine.*v. 24, n. 21,p. 4562-4564, 2006.

CRILL, D.W & Chang, G.J Localization and Characterization of Flavivirus Envelope Glycoprotein Cross-Reactive Epitopes. *Journal of Virology*, v.78, n. 24, p. 13975-13986, 2004

CRUZ, H.J; Ferreira, A.S; Freitas,C.M et al. Metabolic responses to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 51, p. 579–585, 1999.

CRUZ, H.J; Freitas, C.M; Alves, P.M et al. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme Microb Technol.* v. 27, p. 43–52, 2000.

CUSTER, D.M, Thompson, E & Schmaljohn, C.S. Active and passive vaccination against hantavirus pulmonary syndrome with Andes virus M genome segment-based DNA vaccine. *J Virol.* v.77, n.18, p. 9894-9905, 2003.

CUZZUBBO, A.J; David, V.W; Nisalak, A. Comparison of PanBio Dengue Duo Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and MRL Dengue Fever Virus Immunoglobulin M Capture ELISA for Diagnosis of Dengue Virus Infections in Southeast Asia. *Clinical and Diagnostic Laboratory*. v. 6, n. 5, p. 705–712, 1999.

DALILI, M; Sayles, G.D; Ollis, D.F. Glutamine-limited batch hybridoma growth and antibody production: experiment and model. *Biotechnol Bioeng*. v. 36, p. 74–82, 1990.

DESPRÈS, P; Frenkiel, M.P; Deubel, V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology*, v.196, n.1, p.209 – 19, 1993.

DITTMAR, D; Haines, H.G; Castro, A. Monoclonal antibodies specific for dengue virus type 3. *J Clin Microbiol*. v.12, n 1, p.74-78, 1980.

DOMINGUES, R.B; Kuster, G.W; Onuki-Castro, F.L et al. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *J Neurol Sci*. v.267, n. 1-2, p. 36 - 40, 2008.

DZAGUROSOVA ,T.K; Tkachenko, E.A; Slonova, R.A. The antigenic differentiation of hantaviruses by using monoclonal antibodies. *Med Parazitol (Mosk)*. v.3, p.47-52, 1996 - *Abstract*

EGLOFF, M.P; Decroly, E; Malet, H et al. Structural and functional analysis of methylation and 5'-RNA sequence requirements of short capped RNAs by the methyltransferase domain of dengue virus NS5. *Mol Biol*. v.372, n.3, p.723-736, 2007.

ELGH, F.A; Lundkvist, O.A; Alexeyev, H et al. A major antigenic domains for the human humoral response to Puumala virus nucleocapsid protein is located at the amino-terminus. *J.Virol.Methods*. v. 59, p. 161-172, 1996.

ENDY, T.P; Nisalak, A; Chunsuttitwat, S et al. Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. *J Infect Dis*. v.189, n.6, p. 990-1000, 2004.

ELGH, F; Lundkvist, A; Alexeyev, A.O. Serological diagnosis of hantavirus infections by an enzyme-linked immunosorbent assay based on detection of immunoglobulin G and M responses to recombinant nucleocapsid proteins of five viral serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. v.35, n.5, p. 1122-1130, 1997.

ENGELTHALER, D.M; Mosley, D.G; Cheek, J.E et al. Climatic and environmental patterns associated with hantavirus pulmonary syndrome, four corners region, United States. *Emerg Infect Dis* Vol. 5(1), p. 87-94, 1999.

ELKHOURY, M.R ; WADA, M. Y; LUNA, E. J. Aspectos epidemiológicos da infecção e patogenicidade por hantavírus no Brasil 2004. *Boletim Epidemiológico Eletrônico. Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde*, v. 5, n. 3, p. 1-5, 2005.

FAIGOUT, B. et al. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol.* v. 65, n.5, p. 2467-2475, 1991.

FALCONAR, A.K, Young, P.R. Production of dimer-specific and dengue virus group cross-reactive mouse monoclonal antibodies to the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol.* v. 72, p. 961-5, 1991.

FALCONAR, A.K. Identification of an epitope on the dengue virus membrane (M) protein defined by cross-protective monoclonal antibodies: design of an improved epitope sequence base on common determinants present in both envelope (E and M) proteins. *Arch. Virol.* v.144, n.12, p. 2313-2330, 1999.

_____. Antibody responses are generated to immunodominant ELK/KLE-type motifs on the nonstructural-1 glycoprotein during live dengue virus infections in mice and humans: implications for diagnosis, pathogenesis, and vaccine design. *Clin Vaccine Immunol.* v.14, n.5, p. 493-504, 2007.

_____. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol.* v.142(5), p.897-916, 1997.

FALKENBERG, F. W. Production of monoclonal antibodies in the miniPERM bioreactor: comparison with other hybridoma culture methods. *Res Immunol.* v. 149(6), p. 560-70, 1998.

FELDMANN, H; Sanchez, A.S; Morzunov, C.F et al. Utilization of autopsy RNA for the synthesis of the nucleocapsid antigen of a newly recognized virus associated with hantavirus pulmonary syndrome. *Virus Res.* v 30, p. 351-367, 1993.

FRANCO, M.C; Gibbs, C.J; Lee, P.W et al. Monoclonal antibodies specific for Hantaan virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v.80, n13, p.4149-4153, 1983.

GAVRILOVSKAYA, I.N; Apekina, N.S; Myasnikov, Y et al. Features of circulation of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus among small mammals in the European U.S.S.R. *Arch Virol.* v.75, n.4, p.313-316, 1983.

GAVRILOVSKAYA, I.N; LaMonica, R; Fay, M.E et al. New York 1 and Sin Nombre viruses are serotypically distinct viruses associated with hantavirus pulmonary syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.37, n.1, p.122-126, 1999.

GLASS, G.E. et al. Black Creek Canal virus infection in *Sigmodon hispidus* in southern Florida. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.59, p.699-703, 2002.

GONÇALVES, A.P; Eagle, R; Claire, M.S. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. *V.*104, n.22, p.9422-9427, 2007.

GOMES, A.V.L; Silva, A. M; Cordeiro, M.T. et al. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers for the identification of dengue virus serotypes. *J Virol Methods*, v. 145, n. 1, p. 76 – 79, 2008.

GOUDAR, C.T; Joeris, K; Konstantinov, K.B et al. Logistic equations effectively model mammalian cell batch and fed-batch kinetic by logically constraining the fit. *Biotechnol Prog.* . v. 21, p. 1109–1118, 2005.

- GOULD, E.A; Clegg, J.C.S. Growth, titration and purification of togaviruses. In: Mahy BVJ (ed). Virology: a practical approach. Oxford University Press, Oxford, pg. 43-88, 1986.
- GROEN, J; Koraka, P; Velzing, J et al. Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. Clin. Diagn. Lab. Immunol, v. 7, p.867-871, 2000.
- GÜNTHER, C; Rang, A; Lütkeke, N et al. Hantavirus-induced immunity in rodent reservoirs and humans. v. 225, n.1, p. 163-189, 2008.
- HA, I.S; Choi, Y; Park, Y.S et al. Development of monoclonal antibodies against Hantaan virus nucleocapsid protein. Clin Diagn Lab Immunol.v.2, n.4, p.439-442, 1995.
- HENCHAL, E.A; Gentry, M.k; McCown, J.M; Brandt, W.E. Dengue virus specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. Am. J. Trop Med Hyg, v.31, p, 830-836, 1982.
- HERZENBERG, L.A, De Rosa, S.C. Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. Immunol Today. v. 21(8), p. 383-90, 2000. Review.
- HJELLE, B; Jenison, N.S; Martinez, T.B et al. Rapid and specific detection of Sin Nombre virus antibodies in patients with hantavirus pulmonary syndrome by a strip immunoblot assay suitable for field diagnosis. J. Clin. Microbiol., Washington, v.35, n.3, p.600-608, 1997.
- HUANG, K.J; Lin, Y.S; Liu, H.S et al. Generation of anti-platelet autoantibody during dengue virus infection. American Journal of Infectious Diseases. v. 4, n.1, p. 50-59, 2008.
- HUANG, K. J; Yang, Y.C; Lin, Y.S et al. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. J. Immunol. v. 176, p. 2825-2832, 2006.
- HUI, S.W & Stenger, D.A. Electroporation of cells: hybridoma production by electroporation and polyethylene glycol. Methods in Enzymol. v. 220, p.212-227, 1993.
- IGARASHI, M & Bando, Y. Enhanced efficiency of cell hybridization by neuraminidase treatment. J. Immunol. Methods. v. 135, n. 1-2, p. 91-93, 1990.
- IVANOV, A.P; Dzagurova, T.K; Dekonenko, A.E et al. A system of immunoenzyme analysis using biotinylated monoclonal antibodies for typing hantavirus antigens. Vopr Virusol.v .41, n.6, p. 263-265, 1996. *Abstract*
- IVERSEN, L.B. et al. Infecção humana por hantavirus nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Rev. Ass. Med. Bras., São Paulo, v.40, n.2, p.85-92, 1994.
- JOHNSON, A.M. et al. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. Virology, New York, v.238, p.115-127, 1997.
- JORDÁN, J.L.M; Maudry, L.R; Ashour, J et al. Inhibition of Alpha/Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. Journal of Virology. v. 79, n. 13, p. 8004-8013, 2005.
- KARSTEN, U; Stolley, P; Seidel, B. Polyethylene glycol and electric field – mediated cell fusion for formation of hybridomas. Methods in Enzymol. v. 229, p. 228 – 238, 1993.

- KAUFMAN, B.M; Summers, P.L; Dubois, D.R et al. Monoclonal antibodies for dengue virus prM glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 41, n.5, p.576-580, 1989.
- KOBAYASHI, Y; Hasegawa, H; Oyama, T. et al. Antigenic analysis of Japanese encephalitis virus by using monoclonal antibodies. *Infection and immunity*, v. 44, n.1, p. 117-123, 1984.
- KÖHLER, G; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. Vol. 256, 1975.
- KORAKA, P; Zupanc, A.T; Osterhaus, A.D et al. Evaluation of two commercially available immunoassay for the detection of hantavirus antibodies in serum samples. *J. Clin Virol.* v. 17, n.3, p. 189-196, 2000.
- KOKKO, K. H; Lundkvist, A.A; Plyusnin, T et al. Antigenic properties and diagnostic potential of recombinant Dobrava virus nucleocapsid protein. *J. Med. Virol.* v.61, p. 266-274, 2000.
- KUBY, J; Cameron, J; Todd, C; Mitchell, J. *Kuby Immunologia*. 4^a ed. Rio de Janeiro: Irvraria e Editora Revinter Ltda; 2002.
- KUKKONEN, S.K; Vaheri, A; Plyusnin, A. L protein, the RNA-dependent RNA polymerase of hantaviruses. *Arch Virol.* v. 150, n.3, p. 533-556, 2005.
- KUNO, G; Gubler, D.J; Santiago, W. Antigen capture ELISA for the identification of dengue viruses. *Virol Methods*. v.12, n.1-2, p.93-103, 1985.
- LAEMMLI, U.K & Favre, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J Mol Biol.* v.80, n.4, p.575-599, 1973.
- LAI, C.Y; Tsai, W.Y; Lin, S.R et al. Antibodies to Envelope Glycoprotein of Dengue Virus during the Natural Course of Infection Are Predominantly Cross-Reactive and Recognize Epitopes Containing Highly Conserved Residues at the Fusion Loop of Domain II. *Virol.* v. 83, n. 13, p. 6631-6643, 2008.
- LAMBERT, N & Merten, O.W. Effect of serum-free and serum-containing medium on cellular levels of ER-based proteins in various mouse hybridoma cell lines. *Biotechnol Bioeng.* v. 54, p. 165–180, 1997.
- LANCIOTTI, R.S; Calisher, C.H; Gubler, D.J et al. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 30, n. 3, p. 545-51, 1992.
- LANE, R.D; Crissman, R. S; Ginn, S. High efficiency fusion procedure for producing monoclonal antibodies against weak immunogens. *Methods in enzymol.* v. 121, p. 183 – 192, 1986.
- LANE, R.D; Crissman, R. S; Lachman, M.F. Comparison of polyethylene glycols as fusogens for producing lymphocyte-myeloma hybrids. *J. Immunol. Methods*. v. 72, n. 1, p.71 – 76, 1984.
- LEDNIKY, J.A.; Hantaviruses: a short review. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, Chicago, v.127, p.30-35, 2003.
- LEE, H.W & Johnson, K.M. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* v. 137, p. 298-308, 1978.

- LEVIS, S. et al. Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.177, p.529–538, 1998.
- LIBRATY, D.H. High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. *The Journal of Infectious Diseases*. V. 186, p. 1165–1168, 2002.
- LIN, C.F; Lei, H.Y; Liu, C.C et al. Generation of IgM Anti-platelet Autoantibody in Dengue Patients. *J. Med. Virol.*v. 63, p. 143-149, 2001.
- LINDENBACK, D.B & Rice, C.M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM & Fields BN: *Fields Virology*. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. New York. p. 991-1042, 2001.
- LONBERG, N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. *Current Opinion in Immunology*. v. 20, p. 450–459, 2008.
- LUNDVKVIST, A & Niklasson, B. Bank vole monoclonal antibodies against Puumala virus envelope glycoproteins: identification of epitopes involved in neutralization. *Arch Virol.*v.126, n.1-4, p.:93-105, 1992.
- LUO, D. Crystal Structure of the NS3 Protease-Helicase from Dengue Virus. *Journal of Virology*, v. 82, n.1, p.173-183, 2008.
- MA, L; Jones, C.T; Groesch, T.D et al. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.101, n. 10, p.3414-3419, 2004
- MCKEEHAN, W.L. Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. *Cell Biol Int Rep*. v. 6, p. 635–649, 1982.
- MEISEL, H; Wolbert, A; Razanskiene, A et al. Development of a novel immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM enzyme immunoassay based on recombinant Puumala and Dobrava hantavirus nucleocapsid protein. *Clinical and vaccine Immunology*. v.13, n.2, p. 1349-1357, 2006.
- MEDIN, C.L; Fitzgerald, K.A; Rothman, A.L. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *Virol.*v. 79, n.17, p.:11053-11061, 2005.
- MENDES, W. S; Aragão, N.J; Santos, H.J et al. Hantavirus pulmonary syndrome in Anajatuba, Maranhão, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 43:237-240, 2001.
- MILLER, W.M; Wilke, C.R; Blanch, H.W. Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture. *Bioprocess Eng*. v. 3, p. 113–122, 1988.
- MIR, M.A; Brown, B; Hjelle, B et al. Hantavirus N protein exhibits genus-specific recognition of the viral RNA panhandle. *J Virol.*v.80, n.2, p.11283-11292, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. Casos e Óbitos por Hantavirose por Unidade Federada Provável de Infecção e Ano. Brasil, 1993 – 2008. Disponível em: <ministeriodasaude.gov.br. Acesso em 13/05/2008>, 2008.

MODIS, Y; Ogata, S; Clements, D; Harrison, SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(12):6989-6991, 2003.

MONATH, T; Wands, J.R; Hill, L.J et al. Multisite monoclonal immunoassay for dengue viruses: detection of viraemic human sera and interference by heterologous antibody. *J Gen Virol.* v.67, n.4, p.639-650, 1983.

MONGKOLSAPAYA, J; Dejnirattisai, W; Xu, X.N et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* v. 9, n.7, p. 921-927, 2003.

MORREY, J. D; Siddharthan, V; Wang, H et al.. West Nile virus-induced acute flaccid paralysis is prevented by monoclonal antibody treatment when administered after infection of spinal cord neurons. *J Neurovirol.* v.14, n.2, p.152-163, 2008

MURGUE, B; Cassar, O; Guigon, M; Chungue, E. Dengue virus inhibits human hematopoietic progenitor growth in vitro. *J Infect Dis*, v. 175(6), p.1497-501, 1997.

NAVARRETE, M ; Barrera, C ; Zaror, L et al. Rapid immunochromatographic test for hantavirus andes contrasted with capture- IgM ELISA for detection of Andes-specific IgM antibodies. *J. Med. Virol.* v. 79, n.1, p. 41-44, 2007.

NAWA, M ; Takasaki, T ; Yamada, K.I et al. Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody. *J. Virol Methods.* v. 92, n.1, p. 65-70, 2001.

NELSON, P.N; Reynolds, G.M; Waldron, E.E. et al. Desmystified... Monoclonal Antibodies, *J. Clin. Pathol.* v. 53, p. 111-117, 2000.

NICHOL, S.T ; Spiropoulou, C; Morzunov, S. et al. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science*, Washington, v.262, n.5, p.914-917, 1993.

NICHOL, S.T. Bunyaviruses. In: KNIPE, A.M.; HOWLEY, P.M. **Field's Virology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. v.2. p.1603-1633. 1. CD ROOM.

NOLTE, K.B; Feddersen, R.M; Foucar, K et al. Hantavirus pulmonary syndrome in the United States: a pathological description of a disease caused by a new agent. *Hum. Pathol.*, Philadelphia, v.26, n.1, p.110-120, 1995.

NOWINSKI, R.C; Tam, M.R; Goldstein, L.C et al. Monoclonal antibodies for diagnosis of infectious diseases in humans. *Science.* v. 219(4585), p 637-44, 1983.

NUZUM, E.O; Rossi, C.A; Stephenson, E.H et al. Aerosol transmission of Hantaan and related viruses to laboratory rats. *Am J Trop Med Hyg.* v. 38, n , p. 636-640, 1988.

OI, V.T; Vuong, T.M; Hardy, J et al. Correlation between segmental flexibility and effector function of antibodies. *Nature.* v. 307, p. 136 – 140, 1984.

- OLIPHANT, T; Engle, M; Nybakken, G.E et al.. Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat Med.* v.11, n.5, p. 522-530, 2005
- PADULA, P.J; Colavecchia, S.B; Martínez, V.P et al. Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in south America. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.38, n.8, p.3029-3035, 2000.
- PAVRI, K.M & Ghosh, S.N. Complement-fixation tests for simultaneous isolation and identification of dengue viruses, using tissue cultures. *Bull. W.H.O.*, v. 40, p.984-986, 1969.
- PEIRIS, M. Pathogenesis of avian flu H5N1 and SARS. *Novartis Found Symp.* 279:56-60, 2006.
- PETERS, C.J; Khan, A.S. Hantavirus pulmonary syndrome: the new American hemorrhagic fever. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago, v.34, p.1224-1231, 2002.
- PETTY, S.S; Austin, S.K; Purtha, W.E. Type- and Subcomplex-Specific Neutralizing Antibodies against Domain III of Dengue Virus Type 2 Envelope Protein Recognize Adjacent Epitopes. *JOURNAL OF VIROLOGY*, v. 81, n.23, p. 12816–12826, 2007.
- PINI, N; Levis, S; Calderón, G et al. Hantavirus infection in humans and rodents, northwestern Argentina. *Emerg Infect Dis.* v. 9, n.9, p. 1070-1076, 2003.
- PORTAL DA SAÚDE. Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Abril de 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>. Acesso em 3 de fevereiro de 2008.
- POERCH, C; Pavoni, D; Queiroz, M et al. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. *Journal of Clinical Virology.* v. 32, n. 4, p. 272-277, 2005.
- PRAVTCHEVA, D. D & Ruddle, F.H. X chromosome-induced reversion of chromosome segregation in mouse/Chinese hamster somatic cell hybrids. Cellular recognition of native and foreign X chromosomes. *Exp Cell Res.* v. 146, n.2, p. 401-416, 1983.
- RABONI, S.M. Caracterização Molecular de Hantavírus: Estudos Filogenéticos e Geração de Insumos Para Diagnóstico e Prevenção da Hantavirose. Tese de Doutorado apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 113 pg, 2006.
- RABONI, S.M; Levi, S; Rosa, E.S.T.; Bisordi, et al. Hantavirus Infection in Brazil: Development and Evaluation of an Enzyme Immunoassay and Immunoblotting Based on N Recombinant Protein. *Diagn Microbiol Infec Dis.* v. 58(1): 89-97, 2007.
- RAVKOV, E. V & Compans, R. W. Hantavirus Nucleocapsid Protein Is Expressed as a Membrane-Associated Protein in the Perinuclear Region. *Journal of Virology.* v. 75, n. 4, p. 1808–1815, 2001.
- REYNES, J.M et al. Improved molecular detection of dengue virus serotype 1 variants. *J Clin Microbiol.*, n. 41(8), p. 3864-7, 2003.
- REY, F.A et al. The envelope glycoprotein E from tick-borne encephalitis virus as 2A resolution. *Nature.* 375:291-298, 1995.

_____ Dengue virus envelope glycoprotein structure: New insight into its interactions during viral entry. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 100(12):6899-6901, 2003.

RIGAU-Pérez, J.G et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*, 352:971-977, 1998.

RIZVANOVA, A.A; Geelen, A.G; Morzunov, S et al. Generation of a recombinant cytomegalovirus for expression of a hantavirus glycoprotein. *J Virol.* v.77, n.22, p.12203-12210, 2003

ROEHRIG, J.T; Bolin, R.A; Kelly, R.G. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology.* v. 246(2), p. 317-28, 1998.

ROTHMAN, A.L & Ennis, F.A Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology*, 257:1-6, 1999.

RUO, S.L; Sanchez, A; Elliott, L.H et al. Monoclonal antibodies to three strains of hantaviruses: Hantaan, R22, and Puumala. *Arch Virol.* v. 119, n 1-2, p. 1-11, 1991.

SADON, N; Delers, A; Jarman, R et al. A new quantitative RT-PCR method for sensitive detection of dengue virus in serum samples. *Journal of Virological Methods.* v. 153, n. 1, p. 1-6, 2008.

SANTOS, N.Q; Azoulbel, A.C.B; Lopes. et al. A.A.Guillain-Barré syndrome in the course of dengue. *Arq Neuropsiquiatr.* v. 62, n. 1, p. 144-146, 2004.

SCHILLING, S.; Ludolfs, D.;Van, A.N.; Schmitz, H. Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. *Journal Clinical Virology*, v. 31, n.3, p.179-84, 2004

SCHMALJOHN, C.S; Hjelle, B. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg. Infect. Dis.*, Atlanta, v.3, n.2, p.95-104, 1997.

SCHMITT, J.J; Zimmermann, U; Neil, G.A. Efficient generation of stable antibody forming hybridoma cells by electrofusion. *Hybridoma.* v. 8, n. 1, p.107 -115, 1989.

SCHNEIDER, M; Marison, I.W; Stockar, .V. U. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J Biotechnol.* v. 46, p. 161–185, 1996.

SIMANTINI, E; Banerjee, K. Epitope mapping of dengue 1 virus E glycoprotein using monoclonal antibodies. *Arch Virol*, v. 140, p.1257-1273, 1995.

SIRAGANIAN, R. P; Fox, P.C; Berenstein, E.H. Methods of enhancing the frequency of antigen-specific hybridomas. *Methods Enzymol.* v. 92, p. 17-26, 1983.

SJÖLANDER, K.B; Kokko, K.H; Vapalahti, O et al. Evaluation of serological methods for diagnosis of Puumala hantavirus infection (nephropathia epidemica). *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.35, n.12, p.3264-3268, 1997.

SOLOMON, T et al. Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet*, 355:1053-1059, 2000.

STAHL, C; Staehelin, T; Miggiano, V. Spleen cell analysis and optimal immunization for high-frequency production of specific hybridomas. *Methods in Enzymol.* v. 92, p. 26-36, 1983.

SVETLANA, K.F; Morzunov, S.P; Stephen, S.J. et al. Hantavirus: Molecular Biology, Evolution and Pathogenesis. v. 5, n. 8, p. 773-790, 2005.

TAGGART, R.T; Samloff, I.M. Stable antibody-producing murine hybridomas. *Science*. v. 219, n. 4589, p. 1228-1230, 1983.

TAN, C.H.C; Yap, E.H; Singh, M. et al. Passive protection studies in mice with monoclonal antibodies directed against the non-structural protein NS3 of dengue 1 virus. *Journal of general virology*. v. 71, p. 745 -748, 1990.

THULLIER, P; Demangel, C; Bedouelle, H et al. Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism. *J Gen Virol*. v . 82, n.8, p. 1885-92, 2001.

VAJPAYEE, M; Singh, U.B; Seth, P et al. Comparative evaluation of various commercial assays for diagnosis of dengue fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Healthy*. v 32, n.3, p. 472-475, 2001.

WANG, M; Rossi, C; Schmaljohn, C.S. Expression of non-conserved regions of the S genome segments of tree hantaviruses :evaluation of expressed polypeptides for diagnosis of haemorrhagic fever with renal syndrome. *J. Gen. Virol*. v. 74, p. 1115-1124, 1993.

WEISSENBACHER, M.C; Cura, E; Segura, E.L et al. Serological evidence of human Hantavirus infection in Argentina, Bolivia and Uruguay. *Medicina (B Aires)*. v . 56(1), p.17-22, 1996.

WELSH, R.M & Rothman, A.L. Dengue immune response: low affinity, high febrility. *Nat. Med.*, 9(7):820-822, 2003.

WESTERWOULD, R. J. Improved fusion Methods. IV. Technical aspects. *J. Immunol. Methods*.v. 77, n. 2, p. 181-196, 1985.

WONG, T.W; Chan, Y.C; Yap, E.H et al. Serological evidence of hantavirus infection in laboratory rats and personnel. *Int J Epidemiol*. V.17, 4, p.887-890, 1988.

XU, H. et al. Serotype 1-Specific Monoclonal Antibody-Based Antigen Capture Immunoassay for Detection of Circulating Nonstructural Protein NS1: Implications for Early Diagnosis and Serotyping of Dengue Virus Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n.8, p.2872-2878, 2006.

XU, Z; Wei, L; Wang, H et al. The in vitro and in vivo protective activity of monoclonal antibodies directed against Hantaan virus: potential application for immunotherapy and passive immunization. *Biochem Biophys Res Commun*.v.298, n.4, p.552-558, 2002.

YOSHIMATSU, K; Tamura, M; Yoshida, R et al. Characterization of the nucleocapsid protein of Hantaan virus strain 76-118 using monoclonal antibodies. *J Gen Virol*. v. 77, n.4, p.695-704, 1996.

YOUNG, P.R.; Hilditch, P.A.; Bletchly, C.; Halloran, W. An Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reveals High Levels of Dengue Virus Protein NS1 in the Sera of Infected Patients. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 38, n.3, p.1053-1057, 2000.

YU, S; Liang, M; Fan, B et al. Maternally derived recombinant human anti-hantavirus monoclonal antibodies are transferred to mouse offspring during lactation and neutralize virus in vitro. *J Virol*. v.80, n.8, p.4183-4186, 2006.

ZAKI, S.R; Greer, P.W; Coffield, L.M et al. Hantavirus pulmonary syndrome: pathogenesis of an emerging infectious disease. Am. J. Pathol., New York, v.146, n.3, p.552-579, 1995.

ZÖLLER, L; Faulde, M; Meisel, H. Seroprevalence of hantavirus antibodies in Germany as determined by a new recombinant enzyme immunoassay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. v.14, n.4, p.305-313, 1995.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Manuscrito aceito para publicação:

Raboni,S.M; Borba,L; Hoffmann,F.G; Noronha,L; Azevedo,L.M.V;Carstensen,S; Mazzarotto, G.A.C.A; Bordignon, J; Duarte dos Santos, C.N. Evidence of circulation of Laguna Negra-like hantavirus in the Central West of Brazil: Case Report. ***J. Clin. Virology, in press, 2009***

ANEXO 2 - Manuscrito submetido para publicação:

Mazzarotto, G.A.C.A; Raboni, S.M; Stella,V; Carstensen,S ; Noronha,L; Levis, S; Zanluca, C; Zanetti, C.R; Bordignon, J; Duarte dos Santos, C.N. Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of Araucaria Hantavirus. Submetido para o **Journal of Virological Methods** (Em análise)

ANEXO 3 - Meios e Soluções

ANEXO 1

Manuscrito aceito para publicação

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Clinical Virology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Evidence of circulation of Laguna Negra-like hantavirus in the Central West of Brazil: Case Report

Article Type: Case Report

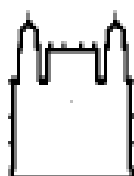
Keywords: Hantavirus pulmonary syndrome; genetic characterization; phylogeny; Laguna Negra-like virus

Corresponding Author: Dr Claudia Nunes Duarte dos Santos, PhD

Corresponding Author's Institution: Instituto de Biologia Molecular do Parana

First Author: Sonia M Raboni, PhD

Order of Authors: Sonia M Raboni, PhD; Luana Borba, MSci; Federico G Hoffmann, PhD; Lucia Noronha, PhD; Marin Luize V Azevedo, Bsc; Suzana Carstensen, Bsc; Giovanny A Mazzarotto, Bsc; Juliano Bordignon, PhD; Claudia N Duarte dos Santos, PhD



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Carlos Chagas – ICC – Fiocruz-PR



Editor Journal of Clinical Virology
W.F. Carman

Dear Editor,

Please find enclosed the manuscript entitled "Evidence of circulation of Laguna Negra-like hantavirus in the Central West of Brazil: Case Report" by Raboni et al., that we would like to submit to Journal of Clinical Virology as a Case Report.

In this manuscript, we report the characterization of a new hantavirus strain (Laguna Negra- like) involved in a fatal HPS case in the Central region of Brazil, and emphasizes the importance of monitoring the seroprevalence for hantaviruses in rodent hosts from different regions which were previously free of hantavirus infection.

On behalf of the co-authors, I declare that the material presented herewith has not been submitted for publication elsewhere. All authors and acknowledged parties have seen and approved the content of the manuscript and have contributed significantly to the work.

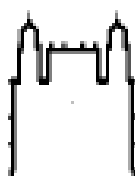
We expect that our manuscript will be well of interest to your journal and we look forward to its review.

Yours Sincerely,

Claudia Nunes Duarte dos Santos

Instituto Carlos Chagas/Fiocruz PR
Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775 - CIC

Instituto Carlos Chagas - ICC - Focruz Paraná
Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775 - Curitiba - PR - 81336-900 - Brasil
Tel: (55-41) 3346-3235



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Carlos Chagas – ICC – Fiocruz-PR



81350-010, Curitiba, PR, Brasil

Tel: (55-41) 33163234/3316 3230

Fax: (55-41) 33163267

E-mail: clsantos@tecpar.br

cnbs@terra.com.br

clsantos@pesquisador.cnpq.br

***Title Page including author details, affiliations and word count)**

Evidence of circulation of Laguna Negra-like hantavirus in the Central West of

Brazil: Case Report

Sonia Mara Raboni MD, PhD^{*}, Luana de Borba MsC^{*}, Federico G. Hoffmann PhD^{*},

Lucia de Noronha MD, PhD^Ψ, Marin Luize Viola Azevedo Bsc^Ψ, Suzana Carstensen

Bsc^{*}; Giovanni ACA Mazzarotto MsC^{*}, Juliano Bordinon PhD^{*} & Claudia Nunes

Duarte dos Santos PhD^{*#}

^{*}Instituto Carlos Chagas, ICC/Fiocruz/PR

^{*}Universidade Federal do Paraná, Brazil

^ΨCentro de Ciências Biológicas e da Saúde, PUCPR, Brazil

#Corresponding author: Instituto Carlos Chagas, ICC/Fiocruz/PR,

Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775, CIC, 81350 010, Curitiba, PR, Brazil

Phone # 55 41 316 3230

Fax # 55 41 316 3267

Email: clsantos@tecpar.br

Article Summary Line: Laguna Negra-like hantavirus in Brazil

Number of words: Abstract: 169. Manuscript: 1,144

1 Abstract

2 Background

3 Hantavirus pulmonary syndrome has been reported with increasing frequency in some Brazilian
4 regions, but information about viral genetic identification is still limited. Recently, the state of Mato
5 Grosso, in the Legal Amazon of Brazil, experienced a growing number of hantavirus pulmonary
6 syndrome (HPS) cases but the genetic characterization of the causative hantavirus is still missing.

7 Objectives

8 Our goal was to identify the hantavirus strain involved in a fatal HPS case in the Central region of
9 Brazil.

10 Study design

11 Nested RT-PCR was conducted on blood clot samples from an HPS patient from Mato Grosso.
12 PCR-positive samples were sequenced, and the resulting sequences were compared with reference
13 samples. Viral antigens were detected by immunohistological analyses in lung and liver tissues.

14 Results

15 Analyses of the viral RNA isolated from the patient identified a Laguna Negra (LN)-like virus as the
16 causative agent and histological analysis of lung sections were compatible with the genetic
17 characterization.

18 Conclusions

19 This is the first report of circulation and human infection by a Laguna Negra-like hantavirus in
20 Brazil.

21

22 Keywords:

23 Hantavirus pulmonary syndrome; genetic characterization; phylogeny; Laguna Negra-like virus;

24 Background

25 Hantaviruses are serologically related members of the family *Bunyaviridae* that occur worldwide in
26 association with rodents and insectivore carriers. These viruses have been linked with two distinct
27 diseases: hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and hantavirus pulmonary syndrome
28 (HPS).¹

29 In Brazil, a surveillance program was implemented in 1993 to monitor HPS cases². Afterwards,
30 evidence for hantavirus infection was described in various regions. In order to identify the
31 hantavirus strain involved with human infections, rodents have been sampled in diverse ecosystems
32 and these studies have uncovered significant genetic diversity among the viruses described. Four
33 different hantaviruses have been associated with HPS cases in Brazil so far, all of them associated
34 with rodent species as hosts. Juititaba-like virus is associated with *Oligoryzomys nigripes* and is
35 found in the Atlantic rainforest and in the south and southeast, Araraquara virus is associated with
36 *Necromys lasiurus* and is found in the savanna (cerrado) region and the central plateau, Castelo dos
37 Sonhos virus is associated with *Oligoryzomys moojeni* and occurs in the Amazon region, and
38 Anajatuba virus is associated with *Oligoryzomys fomesii* and is detected in the northeastern
39 region.³⁻¹⁰

40 The state of Mato Grosso is located in the central west region of Brazil, it is part of legal Amazon
41 and in its west borders Bolivia. Most of the state is covered by equatorial forest. In the west region
42 the *cerrado*, formed by trees up 10m high used to predominate. However, the *cerrado* has now been
43 replaced by agricultural production and pasture in large parts of the state. Human population in the
44 region has grown sharply in the last decade because of migration. Associated with the increase in
45 human population, a growing number of HPS cases have been noted by the Brazilian Ministry of
46 Health.

47 Objectives

48 The objective of this study is identify the hantavirus strain related to a fatal HPS case in Mato
 49 Grosso State, Brazil and determined its phylogenetic relationship with circulating South American
 50 Hantaviruses.

51 **Study Design**

52 Serum and clot samples from a patient suggestive symptoms of hantavirus infections were
 53 tested using specific IgM and IgG antibody assays (ELISA) and RT-PCR for viral RNA detection.
 54 Partial viral genome S segment was sequenced and genotyped by phylogenetic reconstruction. In
 55 addition, histopathological and immunohistochemical studies were performed in issues sections of
 56 lung and liver aiming to characterize the main target sites during hantavirus infection.

57 **Results**

58 The patient was a 19-year-old man farm worker, previously healthy, who lived in Campo Novo do
 59 Parecis, in the west of Mato Grosso (13°40'31"S 57°53'31"W). He was admitted to hospital
 60 reporting 3 days of flu-like symptoms, and after hospitalization, he developed malaise, high fever,
 61 myalgia, headache, dry cough, tiredness, dispnea, back pain, nausea, vomits, abdominal pain and
 62 diarrhea. The initial treatment was intravenous administration of one liter of normal saline solution
 63 and symptomatic drugs. Due to ongoing hypotension and hypoxia, the patient was maintained with
 64 oxygenoterapy. Vasopressors and inotropes drugs were used to uphold blood pressure and cardiac
 65 output. Three hours after his admission at the hospital, he had an asystolic cardiac arrest and
 66 resuscitation efforts were unsuccessful.

67 In the postmortem examination, the main histopathological features were seen in the lung, where
 68 microscopic examination revealed a moderate interstitial pneumonitis with evidence of marked
 69 pulmonary edema and very mild and focal lymphoid infiltrate. Extensive amounts of edema fluid
 70 were seen within the alveoli. Vascular thrombi, endothelial cell necrosis, focal hemorrhages,
 71 ischemic necrosis lesions, cellular responses of neutrophils and respiratory epithelium lesions were
 72 absent. Morphological changes of the endothelium, hen present , consisted of swollen endothelial

73 cells. Microscopic examination of the liver revealed a severe degree of congestion and clusters of
74 hypertrophic and hyperplastic Kupffer cells.

75 Liver and lung tissues were analyzed by immunohistochemistry (IH) assays; the sections of
76 paraffin-embedded tissues were stained with monoclonal antibody to JUQ-like virus (also known as
77 ARAUV) nucleoprotein and a polymer-HRP anti-mouse secondary antibody (Envision⁺ System,
78 DakoCytomation, Inc., CA, USA). The specificity of IH staining was confirmed by replacing first
79 antibodies with phosphate-buffered saline (PBS) or isotypes-identical murine antibodies and a
80 flavivirus monoclonal antibody (4G2). Control tissues included hantavirus infected cells as well as
81 non-HPS autopsy tissues. Viral nucleoproteins were detected in the cytoplasm of the endothelial
82 cells and in infiltrated mononuclear cells from lung (Figure 1).

83 Serologic examination of blood samples, using JUQ-like virus recombinant nucleoprotein antigen¹¹
84 were positive for IgM and IgG. Viral RNA was extracted from blood clot using the High Pure Viral
85 RNA kit (Roche Inc, Mannheim, GE), PCR products were synthesized by nested reverse
86 transcriptase-PCR, primers were selected to amplify S and M segments, as previously reported^{12,13}.
87 One genomic fragment that covers the complete coding sequence of the nucleocapsid protein gene
88 from the S segment was obtained (1.584 bp). The amplified PCR product was purified using Wizard
89 PCR Preps. (Promega, Madison, WI, USA), and cloned into the pGEM-T easy vector (Promega,
90 Madison, USA). Four independent clones were sequenced using an ABI 310 instrument. The
91 nucleotide sequence had been deposited in the GeneBank under the accession number FJ816031. A
92 comparison of the sequence from nucleocapsid gene showed that the closest match to the new
93 sequence was the Laguna Negra virus, which was 86% similar at the nucleotide level, and 96% at
94 the amino acid level. These results were confirmed by neighbor-joining phylogenies (figure
95 Experiments involving human samples were approved by Ethical Committee From Brazilian
96 Ministry of Health (CONEP) under protocol no. 10573.

97

98 **Discussion**

99 In Brazil, despite the increasing training of medical personnel to recognize the clinical symptoms of
100 HPS, mortality rate is still high (~40%). The demarcation of hantavirus transmission areas and the
101 characterization of circulating virus should contribute to better direct control measures. To ident 5
102 its causative agent, we studied a fatal HPS case from the state of Mato Grosso, in the central region
103 of Brazil. This area is of special interest because it presents a growing number of hantavirus
104 infections, and borders Bolivia, where hantavirus circulation is well documented¹⁴⁻¹⁶.

105 In an ecological assessment in Santa Cruz, Bolivia, Carrol et al (2005)¹⁴ found two rodent species with
106 antibodies for hantavirus, *Oligoryzomys microtis* and *Calomys callosus*. The viral nucleotide
107 sequences isolated from two *C. callosus* were 87–88% similar to the Laguna Negra virus and 99%
108 identical to viral sequences obtained from HPS patients in this area, implicating *C. callosus* as the
109 host 109 of Laguna Negra virus. More recently, IgG anti-hantavirus positive *Calomys launcha* rodents
110 were detected in Mato Grosso¹⁷. Our phylogenetic analysis from the hantavirus of a fatal HPS case
111 grouped this virus with the Laguna-Negra hantavirus (figure 2).

112 The observed pulmonary histopathological features are in agreement with those described by Zaki et
113 al¹⁸, consisting of an interstitial pneumonitis with a variable mononuclear cell infiltrate, edema, and
114 focal hyaline membranes. IHC analysis showed widespread presence of hantaviral antigens in
115 endothelial cells of the microvasculature in the lung. Hantaviral antigens were also observed within
116 follicular dendritic cells, macrophages, and lymphocytes.

117 In this report we confirmed the circulation of a Laguna Negra-like hantavirus virus in the west of
118 Brazil and emphasize the importance of monitoring the seroprevalence for hantaviruses in rodent
119 hosts from different regions of Brazil. In addition, the genetic characterization of the involved
120 viruses, is critical to implementing adequate control measures to protect the exposed populations in
121 regions which were previously free of hantavirus infection.

122

Acknowledgments and COI

123 We are indebted with Gisélia Rubio from Departamento de Vigilância, SESA-PR and Irene Skraba
124 from LACEN-PR. The authors thank CNPq, CNPq/Prosul, Fiocruz, Fundação Araucária,
125 CYTED/RIVE and Fundo Paraná for financial support. LB, FGH, SC, GACA, JB and CNDS are
126 CNPq fellowship recipients.

127 The authors have declared that no competing interests exist.

128 *References*

- 129 1. Butler JC, Peters CJ. Hantaviruses and hantavirus pulmonary syndrome, Clin. Infect. Dis.
130 1994;19,387–95.
- 131 2. Coordenação de Controle de Vetores e Antropozoonoses SdVeSMdSB. Dados do Programa de
132 Controle da Hantavirose no Brasil de 1993 a 2008. www.saude.gov.br/svs.
- 133 3. Johnson AM, de Souza LT, Ferreira IB, Pereira LE, Ksiazek TG, Rollin PE, et al. Genetic
134 investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. J Med Virol 1999; 59, 527-35.
- 135 4. Suzuki A, Bisordi I, Levis S, Garcia J, Pereira LE, Souza RP, et al. Identifying rodent hantavirus
136 reservoirs, Brazil. Emerg Infect Dis 2004; 10, 2127-34.
- 137 5. Figueiredo LT, Moreli ML, Campos GM, Sousa RL. Hantaviruses in São Paulo State, Brazil.
138 Emerg Infect Dis 2003; 9, 891-92.
- 139 6. Rosa ES, Mills JN, Padula PJ, Elkhoury MR, Ksiazek TG, Mendes WS, et al. Newly recognized
140 hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern Brazil: partial genetic
141 characterization of viruses and serologic implication of likely reservoirs. Vector Borne Zoonotic
142 Dis 2005; 5, 11-19
- 143 7. Figueiredo LTM, Moreli ML, Borges AA, Figueiredo GG, Souza RLM, Aquino VH. Expression
144 of a hantavirus N protein and its efficacy as antigen in immune assays. Braz J Med Biol Res
145 2008; 41, 596-99
- 146 8. Rosa ES, Lemos ERS, Medeiros DBA, Nunes MRT, Smith DB, Silva OV et al. Associação dos
147 casos de síndrome cardiopulmonar por hantavírus na área de influência da BR 324 com o vírus
148 Laguna Negra. In: Abstract of the II Workshop Nacional sobre Pesquisas aplicadas em
149 Hantavirus; Cuiabá, Brazil. 2008, August 26-29; abstract 05. Health Ministry of Brazil.
- 150 9. Rosa ES, Medeiros DBA, Teixeira MR, Smith DB, Pereira AS, Lavocat M et al. Identificação
151 do vírus Castelo dos Sonhos em roedores *Oligoryzomys moojeni* em Campo Novo do Parecis.

- 152 In: Abstract of II Workshop Nacional sobre Pesquisas aplicadas em Hantavirus; Cuiabá, Brazil.
 153 2008, August 26-29; abstract 32. Health Ministry of Brazil.
- 154 10.Delfraro A, Tomé L, D'Elía G, Clara M, Achával F, Russi JC et al. Juquitiba-like hantavirus
 155 from 2 nonrelated rodent species, Uruguay. *Emerg Infect Dis.* 2008;14,1447-51.
- 156 11.Raboni, SM, Levis S, Rosa EST, Bisordi I, Delfraro A, Lemos E et al. Hantavirus infection in
 157 Brazil: development and evaluation of an enzyme immunoassay and immunoblotting based on N
 158 recombinant protein. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;58,89-97.
- 159 12.Raboni SM, Probst CM, Bordignon J, Zeferino A, Duarte dos Santos CN. Hantaviruses in
 160 Central South America: phylogenetic analysis of the S segment from HPS cases in Paraná,
 161 Brazil. *J Med Virol.* 2005;76,553-62.
- 162 13. Johnson AM, Bowen MD, Ksiazek TG, Willians RJ, Bryan RT, Mills JN et al. Laguna Negra
 163 virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology* 1997;238,115-27.
- 164 14.Carroll DS, Mills JN, Montgomery JM, Bausch DG, Blair PJ, Burans JP et al. Hantavirus
 165 pulmonary syndrome in Central Bolivia: relationships between reservoir hosts, habitats, and viral
 166 genotypes. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72,42-6.
- 167 15. Padula P, Della Valle MG, Alai MG, Cortada P, Villagra M, Gianella A. Andes virus and first
 168 case report of Bermejo virus causing fatal pulmonary syndrome. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:437-
 169 9.
- 170 16.Padula PJ, Colavecchia SB, Martínez VP, Gonzalez Della Valle MO, Edelstein A, Miguel SD, et
 171 al. Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries
 172 in South America. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3029-35.
- 173 17.Rosa ES, Lemos ERS, Medeiros DBA, Nunes MRT, Smith DB, Silva OV et al.Associação dos
 174 casos de síndrome cardiopulmonar por hantavírus na área de influência da BR 324 com o vírus
 175 Laguna Negra. In: Abstract of II Workshop Nacional sobre Pesquisas aplicadas em Hantavirus;
 176 Cuiabá, Brazil. 2008;August 26-29; abstract 05. Health Ministry of Brazil.

- 177 18. Zaki SR, Greer PW, Coffield LM, Goldsmith CS, Nolte KB, Foucar K et al. Hantavirus
178 pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am J Pathol* 1995;146,
179 552-79
- 180 19. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W:improving the sensitivity of progressive
181 multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and
182 weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 1994; 22, 4673–80.
- 183 20. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
184 (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007;24, 1596-99.
- 185 21. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of
186 mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993;10,512-26.
- 187 22. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the
188 neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101, 11030-35.
- 189 23. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*
190 1985;39,783-91.

191 **Figure Legends**

192 Figure 1 (colour reproduction only on the online version)

193 Pathological findings in lung and liver tissues of a fatal case of HPS (A) and
 194 immunohistochemistry reaction (B). Hematoxylin-eosin reaction demonstrated severe capillary
 195 congestion (arrow) and extensive edema fluid in alveoli (*) (A, a). In the liver a severe degree
 196 of microvasculature congestion is noted (arrows) (A, b). The immunohistochemistry reaction
 197 confirms the HPS diagnosis, as demonstrated by the positive reaction with JUQ-like virus Mab
 198 313/11E in contrast with the reaction using the isotype control 4G2 Mab (anti-flavivirus group-
 199 specific) (B, b and a).

200 Figure 2

201 Panel A. Neighbor-joining tree based on an 1.287 bp alignment of the complete coding
 202 sequence of the gene encoding for the nucleocapsid protein (N), depicting phylogenetic
 203 relationships between viral sequences from the human patient in our study (HMT 08/02), and
 204 a reference panel obtained from Genbank. Panel B. Neighbor-joining tree based on a 291-
 205 basepairs alignment of the gene encoding for the nucleocapsid protein (N), depicting
 206 phylogenetic relationships between viral sequences from the human patient in our study (HMT
 207 08/02), and a reference panel obtained from Genbank, with 3 additional sequences from Carroll
 208 et al. (2005)¹⁴. In the two cases sequences collected in the human patient HMT 08/02 were similar to
 209 sequences from the Laguna Negra virus (from western Paraguay and Bolivia). Sequences were
 210 aligned with ClustalW¹⁹ and in MEGA version 4²⁰ using the maximum composite likelihood
 211 estimates of the Tamura-Nei distance^{21,22}. Support for the nodes was evaluated with 1000
 212 bootstrap pseudoreplicates²³.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

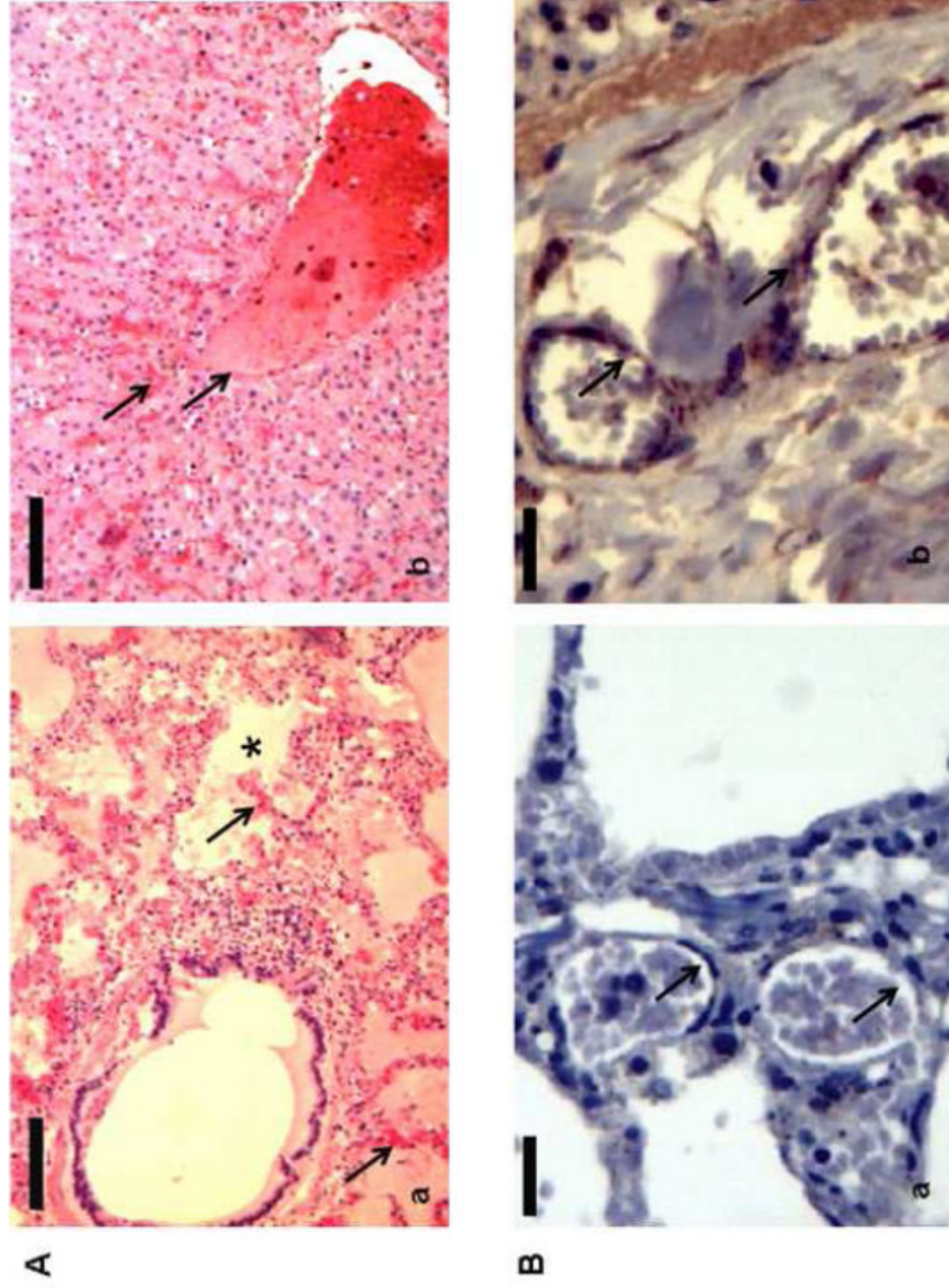
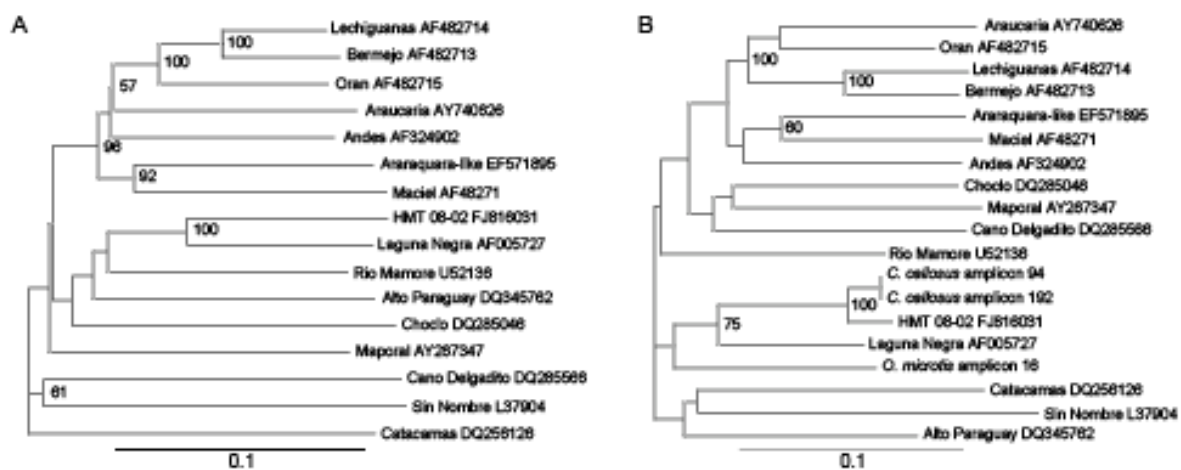


Figure 2



*** Conflicts of Interest Statements**

The authors have declared that no competing interests exist.

ANEXO 2

Manuscrito submetido

Manuscript Number:

Title: Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of Araucaria Hantavirus

Article Type: Research Paper

Keywords: Hantavirus, Monoclonal Antibody, Araucária strain

Corresponding Author: Dr Claudia Nunes Duarte dos Santos, PhD

Corresponding Author's Institution: Instituto Carlos Chagas/Fiocruz PR

First Author: Giovanni A. Mazzarotto, Bsc

Order of Authors: Giovanni A. Mazzarotto, Bsc; Sonia M Raboni, MD PhD; Vanessa Stella, Bsc; Suzana Carstensen, Bsc; Lucia Noronha, MD PhD; Silvana Levis, PhD; Camila Zanluca, Bsc; Carlos R. Zanetti, PhD; Juliano Bordignon, PhD; Claudia Nunes Duarte dos Santos, PhD

Dr. Arie J. Zuckerman
Editor-in-Chief of JVM

Dear Editor,

Please find enclosed the manuscript entitled "Production and characterization of monoclonal antibodies against recombinant nucleoprotein of Aracaria Hantavirus" by Mazzarotto et al., that we would like to submit to Journal of Virological Methods as a research article.

In this manuscript, we described the production and characterization of the first monoclonal antibodies (Mabs) against recombinant nucleoprotein of Aracaria virus, a recently described strain of hantavirus, causing epidemics in south of Brazil. Additionally, to our knowledge these are the first Mabs developed against a hantavirus from South America, what could be of special interested in the development of immunological assays that could enhance our ability to detected hantavirus infections, and study its epidemiology.

On behalf of the co-authors, I declare that the material presented herewith has not been submitted for publication elsewhere. All authors and acknowledged parties have seen and approved the content of the manuscript and have contributed significantly to the work. We expect that our manuscript will be well received by the readers of Journal of Virological Methods, and we look forward to its review.

Yours Sincerely,

Claudia Nunes Duarte dos Santos

• Potential Reviewers

Potencial Reviewers:

- Dr. Juan Arbiza - jarbiza@fciem.edu.uy
Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay
- Dr. Ernesto T.A. Marques Jr – emarques@jhmi.edu
The John Hopkins School of Medicine, Department of Medicine, Division of Infectious Disease. Baltimore, Maryland, USA.
- Dr. Sérgio C. Oliveira – scozeus@icb.ufmg.br
Instituto Ciências Biológicas, Depto. De Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
- Dr. Peter W. Mason – pwmason@utmb.edu
University of Texas Medical Branch, Department of Pathology and Microbiology & Immunology. Galveston, Texas, USA.
- Dra. Michele Bouloy – mbouloy@pasteur.fr
Unité Postulante de Génétique Moléculaire des Bunyaviridés, Institut Pasteur Paris, France.

Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of *Araucaria* Hantavirus

Giovanny A.C.A. Mazzarotto¹; Sonia M. Raboni^{1,2}; Vanessa Stella¹; Suzana Carstensen¹; Lucia de Noronha³; Silvana Levis⁴; Camila Zanluca⁵; Carlos R. Zanetti⁵; Juliano Bordignon^{1*}; Claudia N. D. dos Santos^{1*}

¹Laboratório de Virologia, Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz) Rua Prof Algacyr Munhoz Máder 3775, 81350-010, Curitiba, PR, Brazil; ²Departamento de Saúde Comunitária, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Av. General Carneiro 181, 80060-900, Curitiba, PR, Brazil, ³Laboratório de Patologia Experimental, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR), Rua Imaculada Conceição 1155, 80215-901, Curitiba, PR, Brazil, ⁴Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Júlio I. Maiztegui, Monteagudo 2510-2700, Pergamino, Argentina and ⁵Laboratório de Imunologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

*Corresponding author: Dra. Claudia N. Duarte dos Santos / Dr. Juliano Bordignon.
Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz). Rua Prof. Algacyr Munhoz Máder, 3775.
Cidade Industrial de Curitiba, Curitiba, Paraná. CEP 81350-070. Phone: 55 41 33163230. Fax: 55 41 33163267.
e-mail: clsantos@tecpar.br / jbordig@tecpar.br

Summary

Hantaviruses are rodent-borne RNA viruses that cause hemorrhagic fever with renal syndrome (HCPS) or hantavirus pulmonary syndrome (HPS). From the first detection of infection in Brazil in 1993 until 2008, 1,088 cases of HPS were reported with mortality rates around ~40%. Nowadays, due to the lack of a vaccine or a specific antiviral therapy, the only way to reduce mortality by hantavirus infection is a fast and precise diagnosis that allows for supportive clinical health care. To improve our ability in the detection of hantavirus infection we developed monoclonal antibodies (Mabs) against the nucleoprotein (rN Δ_{85}) of the Araucaria hantavirus strain. We demonstrate that rN Δ_{85} is highly immunogenic for mice. Furthermore, we show that Mabs generated are specific for rN Δ_{85} as demonstrated by western blot, indirect immunofluorescence and immunohistochemistry. The nine Mabs produced and characterized are the first Mabs developed against hantavirus in South America, and could be of special interest to the development of diagnostic assays and epidemiologic studies.

Keywords: Hantavirus, Monoclonal Antibody, Araucária strain

1. Introduction

Hantavirus is a rodent-borne virus that causes hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and hantavirus pulmonary syndrome (HPS) (Schmaljohn & Hjelle, 1997). The virus belongs to genus *Hantavirus*, family *Bunyaviridae* (Beaty & Calisher, 1991), which includes more than 30 distinct virus serotypes/genotypes (Monroe et al. 1999). The hantavirus genome consists of three negative single-stranded RNA segments encoding viral RNA polymerase (L, large), a precursor of two glycoproteins (M, medium; G1 and G2) and a small nucleoprotein (S, small; N) (Plyusnin et al, 1996).

In the Americas, HPS was first described in 1993, associated with fatal cases of pulmonary disease in USA (Nichol et al. 1993). In the same year the virus was identified in three cases of pulmonary disease in Brazil (da Silva et al. 1997). Between 1993 and 2008, 1,077 cases of hantavirus infection were reported in Brazil, with a mortality rate of 40% (Ministry of Health, 2008).

HPS symptoms are not specific and are common to other infectious diseases, like leptospirosis and influenza. In addition, there is no specific treatment or vaccine for HPS. Based on that, rapid and accurate diagnosis early in the course of disease is essential to provide supportive care to the patients, helping to decrease the high mortality rate associated with hantavirus infections (Raboni et al. 2007). The detection of hantavirus infection can be achieved by several molecular and/or immunological techniques (Raboni et al. 2005a, 2007). Among the molecular techniques, the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay is more commonly used, but it must be performed in

the acute phase of infection (Ahn et al. 2000). Another concern about the use of RT-PCR for hantavirus diagnosis is the need for region-specific primers based on the virus nucleotide sequence from a specific geographic region. Raboni et al. (2005a) demonstrated a relevant improvement in the hantavirus detection by nested RT-PCR using region-specific primers (from 9% to 59%) compared with degenerated primers based on the sequence of Laguna Negra virus (Johnson et al. 1997).

Among the serologic assays, ELISA is the most universally used to detect hantavirus infection. A variety of ELISA formats have been designed to improve the sensitivity and specificity of the methodologies (Raboni et al. 2005a). Zöeller et al. (1993) developed an ELISA using recombinant nucleoprotein and monoclonal antibodies (Mabs) of the hantaviruses Hantaan and Puumala. This capture ELISA showed 100% sensitivity and specificity using a panel of human serum of patients suspected of hantavirus infection. Recently our group had developed an indirect enzyme immunoassay (EIA) to detect IgM and IgG in the serum of suspected patients (Raboni et al. 2007).

Currently, the detection of hantavirus infection and clinical supportive care is the only measure that could reduce the mortality associated with the infection. The nucleoprotein is the major antigenic protein of the hantavirus, with immunodominant, cross-reactive epitopes in the N-terminal domain (Elgh et al. 1996; Gött, et al. 1997; Lundkvist et al. 1993; Schmidt et al. 2005). Thus, nucleoprotein is the most appropriated target for use in diagnosis of hantavirus infections. Therefore, the main objective of this work was to generate and characterize Mabs against the recombinant nucleoprotein of Araucaria strain of hantavirus. These Mabs could be used to develop capture-ELISA assays,

immunofluorescence, immunohistochemistry (IHC), and other immunological techniques, which would enhance our ability to detect and confirm suspected cases of hantavirus infection, thus reducing the associated disease mortality and directing control measures strategies.

Materials and Methods

Antigen and immunization protocol

Four young adult (30-45 days) Balb/C mice were used in the immunization protocol with the recombinant nucleoprotein of *Araucaria* hantavirus strain (rNΔ₈₅; Raboni et al. 2007). First, animals were bled for extraction of pre-immune serum, which was then followed by injection of five doses of 50 µg rNΔ₈₅ via intraperitoneal (dose 1 and 3), intradermal (dose 2 and 4) or intravenously (dose 5) route, with one week intervals between each dose. We used complete Freund's adjuvant in dose 1 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and Alu-Gel-S in doses 2 to 4 (Serva, Heidelberg, Germany). No adjuvant was used in dose 5. Experiments involving animals were approved by Ethical Committee in Animal Research from Universidade Federal do Paraná/UFPR under the protocol no. 23075.031314/2008-41.

Cell fusion using PEG

Three days after the last immunization, animals were sacrificed, bled (to obtain post-immune sera) and the spleen was retrieved to obtain B

lymphocytes. The spleen from immunized animals was disrupted and filtered in nylon membranes. Red blood cells were lysed using 5 mL of lysis solution (166 mM NH_4Cl , 9 μM EDTA and 95 mM NaHCO_3) for five minutes on ice. The cell suspension was then washed twice with RPMI medium (Gibco) plus antibiotics (25 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin, 50 UI/ $\mu\text{g/ml}$ penicillin/streptomycin and 2.5 $\mu\text{g/ml}$ of amphotericin B; Gibco), 2 mM of glutamine and 1 mM of sodium pyruvate (SIGMA). Next, spleen cells were fused with Ag8XP3653 myeloma cells (gently supplied by Dr. Carlos R. Zanetti, from Laboratório de Imunologia Aplicada, at Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil) using polyethylenoglycol (SIGMA) 1:1 in RPMI medium for 2 minutes, and washed with RPMI medium (without PEG) for 5 minutes. After fusion, hybrid cells were eluted in RPMI medium with 20% fetal calf serum (FCS) and were plated in 96 wells plates at a concentration of 2.5×10^5 cells/well. After 24h of growth at 37°C and 5% of CO_2 HAT medium (hipoxantine, aminopterin and timidin; SIGMA) was added. Medium was renewed every 48h. Clone selection was performed during twelve days, after which HAT medium was changed for HT medium (hipaxantine and timidin – SIGMA) for four additional days. Once selection was completed, hybrid cells were propagated in RPMI medium with 20% of FCS until tested for antibody secreting clones by ELISA assay.

Isotyping and characterization of monoclonal antibodies

Positive clones were detected by the ELISA assay IBMP HANTEC EIE as described by Raboni et al. (2007). Additionally, positive clones were stabilized by two successive cycles of freezing-thawing, checking for cell growth

and secretion of antibodies at the end of each cycle. Clones that remained positive after these two cycles were submitted to limited dilution. To identify the isotype of Mabs we used the commercial kit SBA Clonotyping™ HRP System (Southern Biotech) following manufacture's instructions.

To confirm the specificity of the clones we performed western blot (WB) analyses using the purified rNΔ₈₅ and *Escherichia coli* (*E. coli*) extract as antigen in a 13% SDS-PAGE. The supernatant of hybrid cells was used as first antibody and anti-mouse polyvalent immunoglobulins (G,A,M)-alkaline phosphatase conjugated (Sigma) as secondary antibody. The reaction was revealed using BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium; Promega, Madison, WI, USA). Additionally, we confirmed the specificity of Mabs in an indirect immunofluorescence assay (IFA) using Vero E6 cells infected with hantavirus, Maciel strain. We used human or murine polyclonal immune sera for hantavirus as positive control, and anti-flavivirus group-specific Mab (4G2) as negative control. Vero E6 cells were fixed with a mixture of cold metanol:acetone (1:1) for at least 1h. The supernatant of hybrid cells was used as first antibody and anti-mouse or anti-human total-Ig labeled with FITC (Sigma) were used to detected reactive Mabs.

Finally we tested one Mab (clone 313/11E) by immunohistochemistry assay against a lung tissue of a 2008 fatal case of HPS in Mato Grosso state, Brazil. Fixed tissues were paraffin embedded, sectioned, and stained with a 4G2 (ATCC HB-112, a mouse Mab) and with RAM11 antibody (anti-rabbit macrophage antibody, Dako, Glostrup, Denmark) as negative control. Goat anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin conjugated to peroxidase-labeled dextran polymer (Envision⁺/Peroxidase, were used as secondary antibody , and liquid

DAB (DakoCytomation®) was used for visualization of cells infected with hantavirus. Antigen recovery was done using ImmunoRetriver Bio SB® Kit (DakoCytomation®, Denmark).

Results

The fusion between spleen cells from four Balb/C mice and mieloma cells generated 440 clones, of which 352 presented cell growth and were tested for secretion of antibodies by ELISA assay (IBMP HANTEC EIE, Raboni et al. 2007). Among the tested clones, 174 showed optical density (O.D.) higher than 0.200, and were considered positive. Due the high number of positive clones we selected 20 that showed higher O.D. (>2.000) to stabilize by freeze-thawing. Nine of the 20 clones maintained cell growth and secretion of high amounts of antibodies after the stabilization protocol (data not shown), and were further used for the characterization tests. These clones were used to perform limited dilution to obtain antibodies of monoclonal origin. After one or two successive limited dilutions, clones were submitted to isotyping using the SBA Clonotyping kit. From the nine clones, seven had an IgG1k isotype, one an IgG2bk and one an IgMk isotype (Table 1).

Western blot analyzes (Figure 1) shows that the nine hybrid cells lines secreted antibodies specific to rNΔ₈₅. Additionally, none of the nine Mabs reacted against *E. coli* extract, confirming the specificity of the Mabs. Interestingly, the results in Figure 1 suggests that the rNΔ₈₅ protein is degraded, as could be observed by the high number of bands of lower sizes than the rNΔ₈₅ (48kDa). Our data show that the Balb/C mice used in this study had no previous

contact with rN Δ_{85} and with *E. coli* antigens, since the pre-immune sera did not recognize rN Δ_{85} and *E. coli* antigens (lanes 1 and 2 of Figure 1). Furthermore, none of 9 Mabs generated cross-reacted with *E. coli* antigens, showing that the rN Δ_{85} purification does not carry *E. coli* proteins. Additionally, an IFA assay using Maciel hantavirus strain confirmed the specificity of Mabs. We could observe a perinuclear fluorescence signal with granular dots (Figure 2), as already suggested by Ha et al. (1995).

We observed that the immunization protocol was efficient, since animals seroconverted to the rN Δ_{85} protein, as can be seen in the post-immune sera by WB and IFA assays (Figure 1, lane 7 and Figure 2C). Finally, we demonstrate that Mab 313/11E detects the hantavirus antigen in lung tissue of a fatal case of hantavirus infection that occurred in Brazil in 2008 (Figure 3). Figure 3 also shows that epithelial cells and mononuclear infiltrating cells (MIC) are the main targets of the infection in the lung tissue.

Discussion

Infection by hantavirus is a public health problem in South America, where it has been associated with high mortality rates, since its introduction in 1993. Aiming to improve the diagnosis of this disease, we developed Mabs against rN Δ_{85} of Araucaria hantavirus strain, a virus recently described in the south region of Brazil (Raboni et al. 2007). The first Mabs against hantaviruses were developed in 1983 by Franko and colleagues, against the Hantaan virus. These Mabs were able to distinguish between different strains of the Hantaan virus (Lee and 760-118 strains), but did not reacted against the Prospect Hill

virus strain (Franko et al. 1983). In the following years the use of Mabs for diagnosis of hantavirus infections had increased, due to the discovery that the nucleoprotein of hantaviruses has conserved antigenic sites among the different virus serotypes/genotypes (Ruo et al. 1991). These conserved antigenic domains could be appropriate for the development of tests to detect the hantavirus infection in human and animal samples (Elgh et al. 1996; Raboni et al. 2005b; Schmidt et al. 2005).

In our protocol of Mabs development we observed a high number of positive clones (174 from 352, 49,4%) when compared to other fusion experiments performed in our laboratory using live dengue virus (5,3% and 15,6%). It is not clear whether these clones are specific to rN_{Δ85} or target other contaminant proteins that could be present in antigen preparation, such as *E. coli* proteins or the histidine-tag (Chen et al. 2008). In agreement to our results, Ha et al. (1995) developed Mabs against Hantaan virus using a formalin inactivated virus. These authors demonstrated that from 45 Mabs 38 were directed against the nucleoprotein of the Hantaan virus, confirming its high immunogenicity. Gött et al. (1997) showed that the human humoral immune response is mainly directed against the amino terminal region of the nucleoprotein of the hantavirus.

The major concern about the fusion protocol used is the stabilization of secreting Mabs clones. Our results shows that from 20 clones submitted to freeze-thawing cycles, only 9 clones continued to secrete antibodies, despite their ability to grow in culture. These findings are in agreement with previous data from Clarck and Milstein (1981), who demonstrated that approximately

50% of hybrid cells lines lose their ability to secrete antibodies due to chromosomal losses.

The results showed in Figures 1 and 2 confirm the specificity of Mabs generated with our protocol. The IFA assay using Maciel hantavirus (a genetically related virus with 93% amino acid identity with Araucaria hantavirus) infected cells showed a perinuclear fluorescence signal, with granular dots, as already demonstrated by Ha et al. (1995). However, we observed a stronger fluorescence signal in infected Vero E6 cells stained with human immune serum (Figure 2B) compared to all nine Mabs tested. This could be explained by the fact that glycoproteins of hantaviruses (G1 and G2) are also highly immunogenic thus eliciting the production of antibodies. In the case of the post-immune murine serum, the most intense reaction (Figure 2C) could be due to the polyclonal origin of the sera.

We show (Figure 3) that one of the Mabs, 313/11E, was able to detect hantavirus antigens in the lung of a fatal case of hantavirus infection that occurred in Brazil in 2008. We observe that Mab 313/11E stained lung epithelial cells and mononuclear infiltrating cells (Figure 3C), corroborating the results of Zaki et al. (1995). These authors performed one of the first pathological descriptions of HPS in tissues of 44 confirmed fatal cases of hantavirus infection. They identified hantavirus antigens in endothelial cells of microvasculature, specially in the lungs, in follicular dendritic cells, lymphocytes and macrophages. Additionally, viral antigen-positive cells were widely distributed in various tissues, including lungs, kidney, heart, spleen, pancreas, lymph node, skeletal muscle, intestine, adrenal gland, adipose tissue, urinary bladder and brain (Zaki et al. 1995). These findings indicate that although the

lungs are the main site of infection, other tissues could also be suitable for diagnosis.

Based on the results presented herein, Mabs generated by our protocol could be used for the development of immunoassays like ELISA to detect IgM and IgG immunoglobulins in the sera of suspected patients. Raboni et al. (2007) developed an indirect ELISA assay for detection of IgM and IgG with high sensitivity and specificity (between 94.1% and 99.1%, respectively). Recently, Wang et al. (2007) develop a capture ELISA using Mabs against the nucleoprotein of hantavirus (Hantaan strain), and compared it to a direct ELISA. They demonstrated that assays using Mabs are more specific for the diagnosis of hantavirus infection, especially in initial stages. The development of an IgM-capture EIA involve the use of a polyclonal IgG anti-hantavirus prepared from serum or ascitic liquid of immunized rabbits to detect the viral antigen. However, these sources have potential problems: (1) the variation from lot to lot, due to the difficulty to keep the same quality of rabbit IgG supply; (2) it may contain other pathogens that require further precautions. Also, it has been shown that capture EIA with Mabs has higher sensitivity than direct EIA without Mabs, mainly because of the lower non-specific reaction of the Mabs to control antigen (Wang et al. 2007; Zöller et al. 1993).

In summary, the Mabs generated and characterized in this work will enhance our ability to detect hantavirus in human and animal samples. Despite their possible use in the development of immunoenzymatic assays, we demonstrated that Mabs are suitable for use in IFA and IHC tests. These two techniques could be relevant to confirm conflicting results obtained between nRT-PCR and ELISA assays. Additionally, to our knowledge, those are the first

Mabs generated against hantavirus strains circulating in Brazil and even in South America, which could increase the specificity of the diagnosis performed in this region.

Acknowledgment

The authors thanks for Dr. Alexandre Dias Tavares Costa for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from CNPq, CNPq/PROSUL, CYTED/RIVE, Fiocruz, Fundação Araucária. GACAM, JB, CRZ and CNDS are fellowships from CNPq.

References

Ahn, C., Cho, J.T., Lee, J.G., Lim, C.S., Kim, Y.Y., Han, J.S., Kim, S., Lee, J.S., 2000. Detection of Hantaan and Seoul viruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) in renal syndrome patients with hemorrhagic fever. Clin. Nephrol. 53(2), 79-89.

Beaty, B.J., Calisher, C.H., 1991. Bunyaviridae: Natural history. Curr top Microbiol Immunol. 169, 27-28.

Clark, M.R., Milstein, C., 1981. Expression of spleen cell immunoglobulin phenotype in hybrids with myeloma cell lines. *Somatic Cell Genet.* 7(6), 657-66.

Chen, Z., Tian, Y., Liu, L., An, J., 2008. Production of a monoclonal against non-structural protein 3 of dengue-2 virus by intrasplenic injection. *Hybridoma* 27(6), 467-71.

da Silva, M.V., Vasconcelos, M.J., Hidalgo, N.T., Veiga, A.P., Canzian, M., Marotto, P.C., de Lima, V.C., 1997. Hantavirus pulmonary syndrome. Report of the first three cases in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 39(4), 231-4.

Elgh, F., Lundkvist, A., Alexeyev, A.O., Wadell, G., Juto, P., 1996. A major antigenic domain for the human humoral response to Puumala virus nucleocapsid protein is located at the amino-terminus. *J. Virol. Methods* 59(1-2), 161-172.

Franko, M.C., Gibbs, C.J. Jr., Lee, P-W., Gajdusek, C., 1983. Monoclonal antibodies specific for Hantaan virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 4149-4153.

Gött, P., Zöller, L., Darai, G., Bautz, E.K., 1997. A major antigenic domain of hantaviruses is located on the aminoproximal site of the viral nucleocapsid protein. *Virus Genes* 14(1), 31-40.

Ha, I.S., Choi, Y., Park, Y.S., Cheong, H.I., Koo, J.W., Kim, I.S., Kim, E.C., Kim, S., Lee, J.S., 1995. Development of Monoclonal Antibodies against Hantaan Virus Nucleocapsid Protein. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 2(4), 439-442.

Johnson, A.M., Bowen, M.D., Ksiazek, T.G., Willians, R.J., Bryan, R.T., Mills, J.N., Peters, C.J., Nichol, S.T., 1997. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology* 238, 115-127.

Lundkvist, A., Scholander, C., Niklasson, B., 1993. Anti-idiotypic antibodies against Puumala virus glycoprotein-specific monoclonal antibodies inhibit virus infection in cell culture. *Arch. Virol.* 132(3), 255-265.

Monroe, M.C., Morzunov, S.P., Johnson, A.M., Bowen, M.D., Artsob, H., Yates, T., Peters, C.J., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Nichol, S.T., 1999. Genetic diversity and distribution of Peromyscus-borne hantavirus in North America. *Emerg Infect. Dis.* 5, 75-86.

Nichol, S.T., Spiropoulou, C.F., Morzunov, S., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Feldmann, H., Sanchez, A., Childs, J., Zaki, S., Peters, C.J., 1993. Genetic

identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262, 914-917.

Plyusnin, A., Vapalahti, O., Vaheri, A., 1996. Hantaviruse: genome, structure, expression and evolution. *J. Gen. Virol.* 77, 2677-87.

Raboni, S.M., Rubio, G., de Borba, L., Zeferino, A., Skraba, I., Goldemberg, S., Duarte dos Santos, C.N., 2005a. Clinical survey of hantavirus in southern Brazil and the development of specific molecular diagnosis tools. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72(6), 800-804.

Raboni, S.M., Probst, C.M., Bordignon, J., Zeferino, A., Duarte dos Santos, C.N., 2005b. Hantavirus in Central South America: phylogenetic analysis of the S segment from HPS cases in Paraná, Brazil. *J. Med. Virol.* 76(4), 553-62.

Raboni, S.M., Levis, S., Rosa, E.S., Bisordi, I., Delfaro, A., Lemos, E., Correia, D.C., Duarte dos Santos, C.N., 2007. Hantavirus infection in Brazil: development and evaluation of an enzyme immunoassay and immunoblotting based on N recombinant protein. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58(1), 89-97.

Ruo, S.L., Sanchez, A., Elliott, L.H., Brammer, L.S., McCormick, JB. Fisher-Hoch, S.P., 1991. Monoclonal antibodies to three strains of hantaviruses: Hantaan, R22, and Puumala. *Arch. Virol.* 119 (1-2), 1-11.

Schmaljohn, C., Hjelle, B., 1997. Hantavirus: a global disease problem. *Emerg Infect. Dis.* 3, 95-104

Schmidt, J., Jandrig, B., Klempa, B., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Meisel, H., Niedrig, M., Pitra, C., Krüger, D.H., Ulrich, R., 2005. Nucleocapsid protein of cell culture-adapted Seoul virus strain 80-39: analysis of its encoding sequence, expression in yeast and immuno-reactivity. *Virus Genes* 30(1), 37-48.

Zaki, S.R., Greer, P.W., Coffield, L.M., Goldsmith, C.S., Nolte, K.B., Foucar, K., Feddersen, R.M., Zumwalt, R.E., Miller, G.L., Khan, A.S., Rollin, P.E., Ksiazek, T. G., Nichol, S.T., Mahy, B.W.J., Peters, C.J., 1995. Hantavirus pulmonary syndrome: Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am. J. Pathol.* 146(3), 552-79.

Zöller, L.G., Yang, S., Gött, P., Bautz, E.K., Darai, G., 1993. A novel mu-capture enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant proteins for sensitive and specific diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 31(5), 1194-9.

Wang, Y.C., Zhang, H.H., Yu, L.S., Zhu, B.C., 2007. Detection of circulating antigen with a mAb-based sandwich-elisa and its comparison with specific igM detection in sera of patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Hybridoma* 26(1), 42-45.

Ministry of Health, 2008. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. Casos e Óbitos por Hantavirose por Unidade Federada Provável de Infecção e Ano. Brail, 1993 – 2008. Disponível em : <www.portal.saude.gov.br. Acesso em 13/05/2008.

Figure legends

Figure 1: Western blot analyzes of anti-rN_{Δ85} Mabs using purified rN_{Δ85} and *E. coli* extract. A 13% SDS-PAGE were used to solve the rN_{Δ85} (odd numbered lanes) and an *E. coli* protein extract (even numbered lanes). Protein samples were stained with Mabs 313/11E (11 and 12), 572/7A (13 and 14), 432/6BF (15 and 16), 305/5A (17 and 18), 350/8C (19 and 20), 475/11C (21 and 22), 581/8G (23 and 24), 651/6G (25 and 26) and 664/10G (27 and 28). As negative control we use pre-immune sera (1 and 2) and flavivirus group-specific Mab (4G2 – 3 and 4), and as positive control we use polyclonal antibody from ascitic fluid (5 and 6), post-immune sera (7 and 8) and anti-histidine Mab (9 and 10) as the protein construct has a histidine-tag in the amino-terminal region.

Figure 2: Indirect immunofluorescence assay in Vero E6 infected with Maciel strain of hantavirus. Cells were fixed and permeabilized with (acetone:methanol) and stained with Mabs against rN_{Δ85} of Araucaria hantavirus strain. As negative control we use flavivirus group-specific Mab, 4G2 (A; isotype control), and human (B) and murine (C) hantavirus-immune sera, both as positive control. Additionally we tested the generated Mabs for recognition of native nucleoprotein: 651/6G (D), 581/8G (E), 572/7A (F), 475/8A (G), 305/5A (H), 350/8C (J), 313/11E (K), 432/6BF (M) and 664/10G (L). Images are from a NIKON ECLIPSE E600 (Nikon, Inc., Melville, NY) with

Image-Pro Plus software version 4.5 (MediaCybernetics, Bethesda, MD). Scale bar are 40 μm .

Figure 3: Immunohistochemistry analysis of lung tissue of a fatal HPS case. Isotype-controls are stained with RAM11 (anti-rabbit macrophage; A) and with flavivirus group-specific antibody (B). We observed that the main cellular targets of hantavirus infection in the lungs are endothelia cells (arrowhead) and mononuclear infiltrating cells (arrows; C and D). Sections were prepared and stained as described in the material and methods, and images were obtained using an Olympus BX 50 with Image-Pro® Plus software version 4.5 (Maryland). Scale bars are 200 μm .

Table 1

Table 1: Clone designation, number of cycles of limited dilution and isotype of each Mab generated and stabilized against rN Δ_{85} .

Clone name	Cycles of limited dilution	Isotype
475/8A	1	IgG1 κ
350/8C	1	IgG1 κ
581/8G	1	IgG1 κ
651/6G	1	IgG1 κ
313/11E	1	IgG1 κ
432/6BF	2	IgG1 κ
303/5A	1	IgG1 κ
572/7A	1	IgG2b κ
664/10G	1	IgM κ

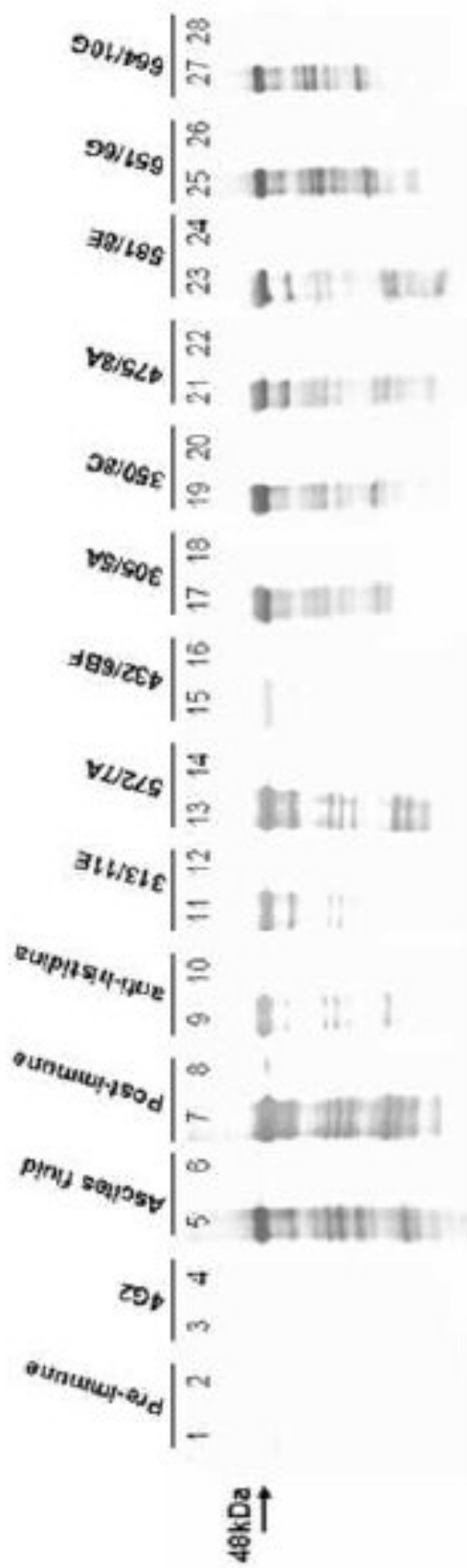


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

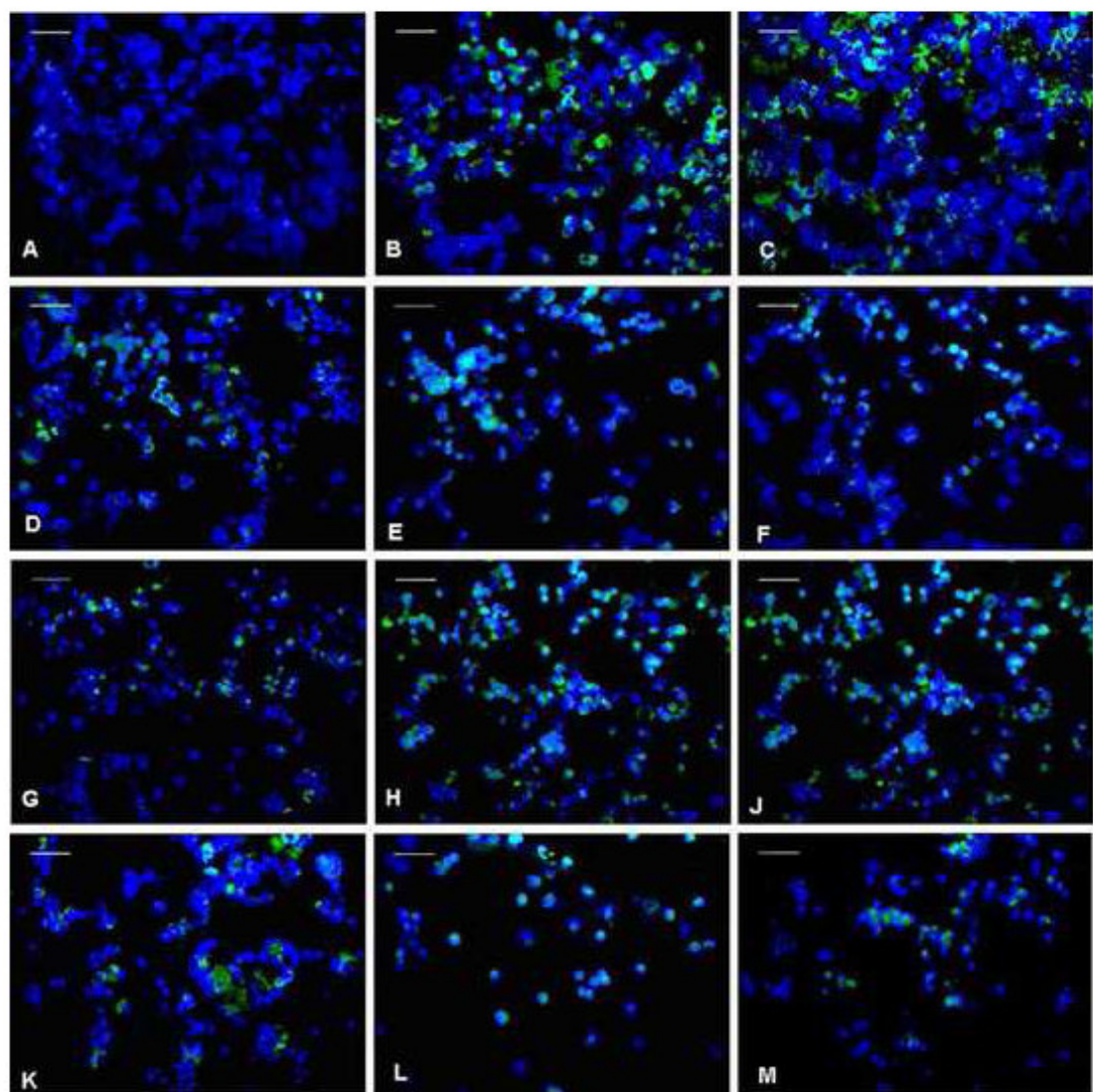
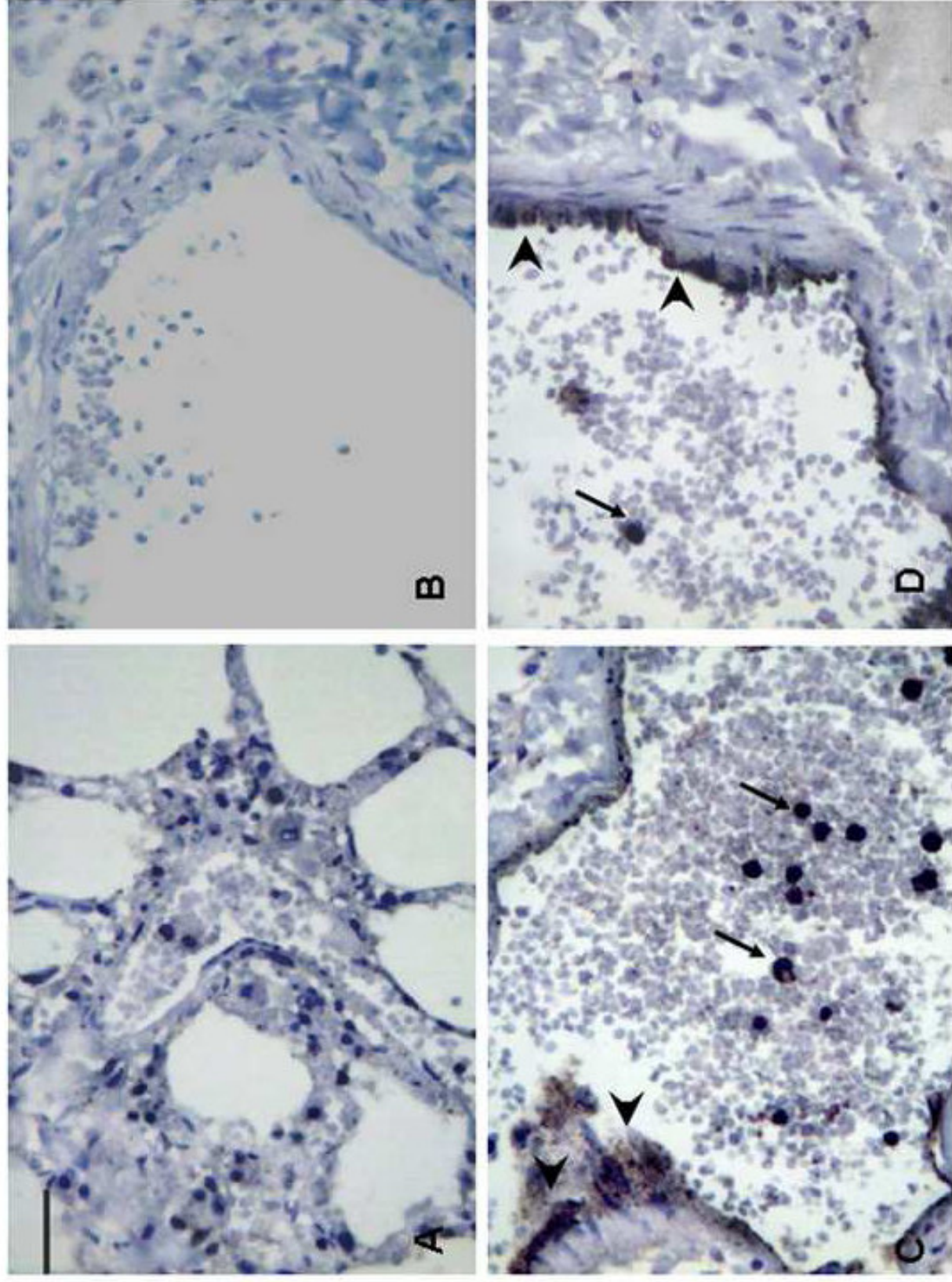


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)



ANEXO 3

Meios e Soluções

Meios e Soluções

Meio RPMI 1640 (para preparo de 4 litros de meio)

Pesar:

41,6 gr de meio RPMI comercial em pó.

8,0 gr de Bicarbonato de Sódio

9,2 gr de Hepes (colocar por último)

Dissolver os reagentes em água MiliQ - ou de pureza semelhante - sob agitação em temperatura ambiente.

O meio resultante deve ser filtrado por membrana 22 μ , ajustado para pH 7,8 com NaOH e estocado em câmara fria ou geladeira.

Para a produção de Meio RPMI completo com 20% de Soro Fetal Bovino o meio deverá ser acrescido de 20% de Soro Fetal Bovino; 1% do volume final de Glutamina 100mM; 1% do volume final de Piruvato de Sódio; 0,5% de Penicilina/Streptomycina e Fungizona; 0,25% do volume final com gentamicina.

Meio para Congelamento de Células

462 μ l de Soro Fetal Bovino

37,5 μ l de DMSO

= 500 μ l de solução completa de congelamento/criotubo

A) A amostra contendo as células para congelamento deve ser centrifugada em 2500 rpm por 4 minutos. B) resuspendidas em solução de congelamento e transferidas para criotubo devidamente rotulado. C) o criotubo deve ser mantido por 1:30 em -20°C: D) em seguida deve ser transferido para Freezer - 70°C por 1:30. E) Por fim, o criotubo deve ser estocado em nitrogênio líquido.

Fusão

- Misturar as células de mieloma com os linfócitos (proporção de 1 mieloma para 5 linfócitos);
- Pelletar as células e tubo de 50 ml;
- Descartar o sobrenadante e adicionar sobre o pellet 1 ml de PEG 50% ⁽¹⁾, homogeneizando durante 2 min;
- Adicionar 1 ml de meio RPMI-1640 lentamente durante 1 min. (2X);
- Adicionar lentamente 7 ml de meio RPMI 1640 sem soro durante 2 min;
- Centrifugar as células por 5 min a 1500 rpm;
- Desprezar o sobrenadante e adicionar cerca de 10 ml de meio RPMI 1640 com Soro Fetal Bovino e forçar dissociação dos grumos;
- Resuspender as células na proporção de $2,5 \times 10^6$ / ml e distribuir nas placas – 100 µl/ poço – $2,5 \times 10^5$ células/ poço.

Manutenção e Triagem dos Hibridomas

1) Manutenção

- Após 24 h da fusão celular, adicionar 100 µl de meio RPMI 1640 com SFB acrescido de HAT;
- Após 48 h, retirar 100 µl de meio dos poços e acrescentar 100 µl com o meio descrito acima; esse procedimento deve ser realizado por cerca de 11-13 dias;
- No 15º dia, retirar 100 µl de meio acrescido de HAT e adicionar 100 µl de RPMI contendo HT;
- No 19º dia, retirar 100 µl de meio e adicionar 100 µl de meio RPMI 1640 com SFB apenas.
- No momento que as células atingirem 75% de confluência , realizar o procedimento para identificação dos anticorpos de interesse

*(1) PEG 50%: Misturar de forma estéril, volumes iguais de PEG e meio RPMI(Sem HEPES e sem SFB).

2) Preparo das placas para triagem dos anticorpos de interesse

- Para triagem dos mAbs anti-Dengue por IFI foram semadas células de mosquito C636 (na proporção de $1,0 \times 10^5$ Células/Poço) em placas de 96 poços.
- Após 24 horas de aderência das células às placas elas foram infectadas com MOI de 1 com a mesma linhagem viral utilizada para o processo de imunização dos animais em meio L15 completo por 48 h;
- Após esse período retirar o inóculo infeccioso, lavar o tapete celular com PBS 1x e fixar com acetona/metanol na proporção de 1:1. A mistura de acetona/metanol deve ser resfriada antes da sua utilização. As placas devem ser fixadas com essa solução por um período mínimo de 2-3 horas.